



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102215872 B

(45) 授权公告日 2015. 06. 10

(21) 申请号 200980145259. 2

(22) 申请日 2009. 09. 17

(30) 优先权数据

08380270. 2 2008. 09. 17 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 05. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/062078 2009. 09. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/031825 EN 2010. 03. 25

(73) 专利权人 特拉斯雷神诺癌症医药有限公司

地址 西班牙巴利阿多利德

(72) 发明人 安娜·拉米勒茨德莫利纳

劳德斯·加西亚奥茨

朱安·卡洛斯·拉卡桑朱安

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 阴亮

(51) Int. Cl.

A61K 45/06(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 1889920 A, 2008. 02. 20, 说明书第
0061-0062 段.

EP 1889920 A, 2008. 02. 20, 说明书第
0061-0062 段.

MORI NORIKO 等. 《Choline kinase
down-regulation increases the effect of
5-fluorouracil in breast cancer cells》.
《CANCER RESEARCH》. 2007, 第 67 卷 (第 23 期),

审查员 耿立冬

权利要求书12页 说明书76页

序列表6页 附图26页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的方法和组合物

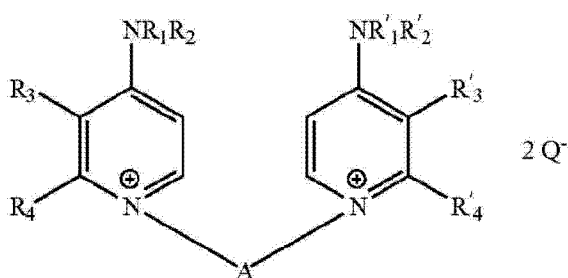
(57) 摘要

本发明涉及包含酸性神经酰胺酶抑制剂和胆碱酯酶抑制剂的组合物, 以及该组合物在治疗癌症中的用途。本发明还涉及基于检测酸性神经酰胺酶水平来为癌症患者选择个体化治疗的方法。此外, 本发明还涉及包含胆碱酯酶抑制剂和化疗剂的组合物, 以及该组合物在治疗癌症中的用途。最后, 本发明还涉及包含胆碱酯酶抑制剂和死亡受体配体的组合物, 以及该组合物在治疗癌症中的用途。

1. 组合物,其分开包含或合在一起地包含第一组分和第二组分,所述第一组分包含一种或多种特异性针对胆碱激酶 α 异形体的胆碱激酶抑制剂,其中所述胆碱激酶抑制剂选自以下的表 1 中的 I 和 II 的化合物,并且所述第二组分选自 (i) 一种或多种酸性神经酰胺酶抑制剂,其中所述酸性神经酰胺酶抑制剂选自以下的表 2 中的 VI 和 VIII 的化合物;(ii) 一种或多种化疗剂,其中所述化疗剂选自顺铂和 5- 氟尿嘧啶;和 (iii) 一种或多种死亡受体配体,其中所述死亡受体配体为 TRAIL,

表 1

I 美国专利申请 US20070185170 中所描述的化合物,该化合物具有以下通式:



其中

Q^- 代表药学上合适的有机或无机酸的共轭碱;

R_1 和 R'_1 彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的芳基;

R_2 和 R'_2 彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的芳基;

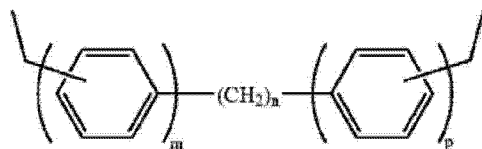
R_3 和 R'_3 或彼此独立地代表选自 H、卤素、三氟甲基、羟基、氨基、烷氧基和任选地被三氟甲基、羟基、氨基或烷氧基取代的 C_{1-6} 烷基的基团,或与 R_4 和 R'_4 一起分别并彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 基团;

R_4 和 R'_4 或彼此独立地代表选自 H 和任选地被卤素、三氟甲基、羟基、氨基或烷氧基取代的 C_{1-6} 烷基的基团,或与 R_3 和 R'_3 一起分别并彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 基团;

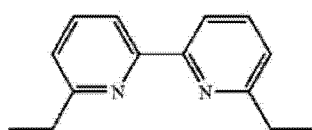
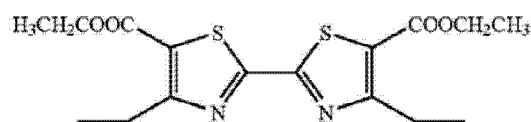
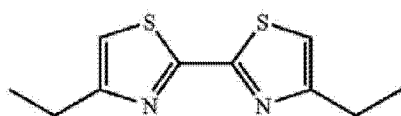
A 代表间隔基团,其包括作为式 I 所限定的结构中存在的两个吡啶

表 1

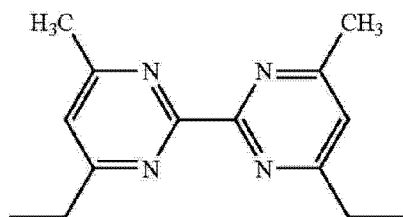
基团之间的连接物的任何二价有机结构，并且特别是具有选自以下的结构的二价分子：



其中 m、n 和 p 代表以下数值的整数：m=0、1；n=0、1-10；p=0、1；并且 m、n 和 p 不能同时为 0，



和



II

国际专利申请 WO9805644 中描述的化合物，其具有以下通用结构式：

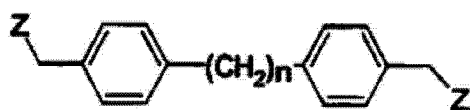
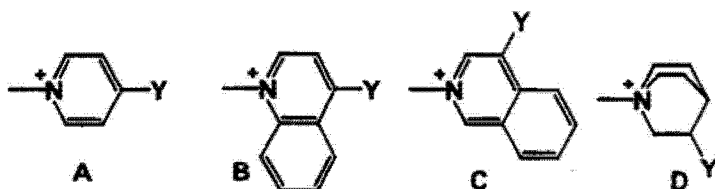


表 1

其中

n 为 0、1、2 或 3

Z 是选自以下的任何结构基团：

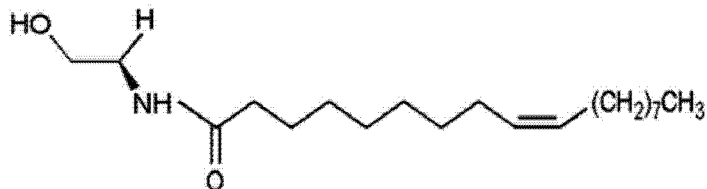


其中 Y 选自 -H、-CH₃、-CH₂-OH、-CO-CH₃、-CN、-NH₂、-N(CH₃)₂、吡咯烷、哌啶、全氢化氮杂卓、-OH、-O-CO-C₁₅H₃₁ 等，

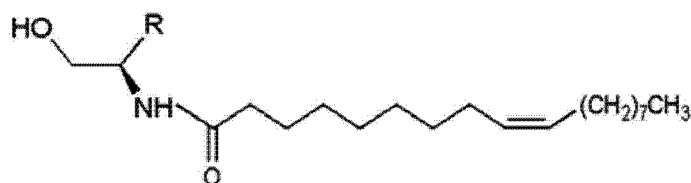
表 2

VI

Sugita et al (Biochim.Biophys.Acta, 1975, 398:125-131)所述的 N-油酰乙醇胺(NOE)，其具有以下结构

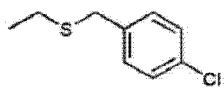
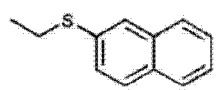
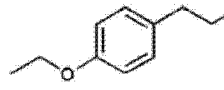
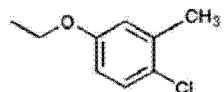
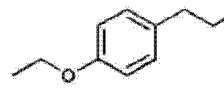
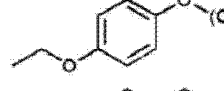
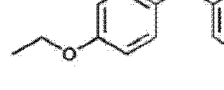
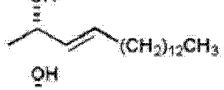
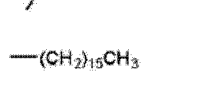
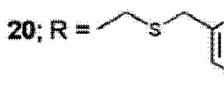
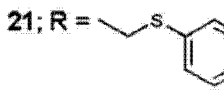
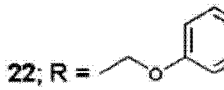
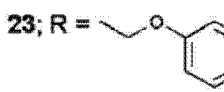
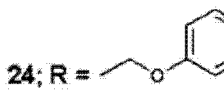
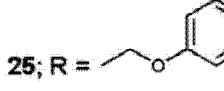
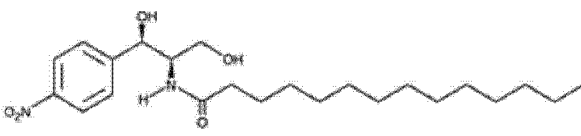


和如 Grijalvo et al., (Chem.Phys.Lipids, 2006, 144:69-84)所述的它的变体，所述变体具有以下通用结构



其中 R 选自

表 2

	1; R = CH₂SCH₂CH₃ 2; R = CH₂S(CH₂)₄CH₃ 3; R = CH₂S(CH₂)₉CH₃ 4; R = CH₂S(CH₂)₁₅CH₃ 5; R =  6; R =  7; R =  8; R =  9; R =  10; R =  11; R =  12; R =  13; R =  14; R =  15; R = -(CH₂)₁₅CH₃ 16; R = CH₂SCH₂CH₃ 17; R = CH₂S(CH₂)₄CH₃ 18; R = CH₂S(CH₂)₉CH₃ 19; R = CH₂S(CH₂)₁₅CH₃ 20; R =  21; R =  22; R =  23; R =  24; R =  25; R = 	
VIII	如 Selzner et al (Cancer Res., 2001, 61:1233-1240)所述的 (1R,2R)-N-肉豆蔻酰氨基-4'-硝基-苯丙二醇-1,3 (B13) (D-NMAPPD), 其具有以下结构  及其类似物	

2. 药物组合物, 其包含权利要求 1 所述的组合物和药学可接受的载体或赋形剂。
3. 用于医药的权利要求 1 所述的组合物。

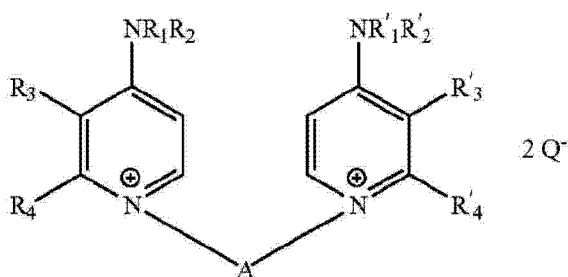
4. 用于治疗癌症的权利要求 1 所述的组合物。

5. 如权利要求 4 所述的组合物, 其中所述癌症是非小细胞肺癌或结肠癌。

6. 特异性针对胆碱激酶 α 异形体的 ChoK 抑制剂和酸性神经酰胺酶抑制剂的组合在制备用于治疗对 ChoK 抑制剂治疗具有抗性的癌症患者的药物中的用途, 其中来自所述患者的样品中酸性神经酰胺酶的水平高于参考样品, 其中所述癌症是非小细胞肺癌或结肠癌, 其中所述胆碱激酶抑制剂选自以下的表 1 中的 I 和 II 的化合物, 所述酸性神经酰胺酶抑制剂选自以下的表 2 中的 VI 和 VIII 的化合物,

表 1

I 美国专利申请 US20070185170 中所描述的化合物, 该化合物具有以下通式:



其中

Q^- 代表药学上合适的有机或无机酸的共轭碱;

R_1 和 R'_1 彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的芳基;

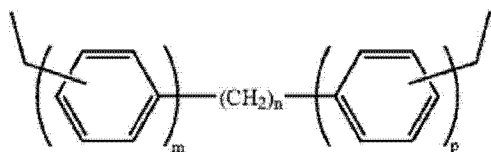
表 1

R_2 和 R'_2 彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的芳基；

R_3 和 R'_3 或彼此独立地代表选自 H、卤素、三氟甲基、羟基、氨基、烷氧基和任选地被三氟甲基、羟基、氨基或烷氧基取代的 C_{1-6} 烷基的基团，或与 R_4 和 R'_4 一起分别并彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的 $-CH=CH-CH=CH-$ 基团；

R_4 和 R'_4 或彼此独立地代表选自 H 和任选地被卤素、三氟甲基、羟基、氨基或烷氧基取代的 C_{1-6} 烷基的基团，或与 R_3 和 R'_3 一起分别并彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的 $-CH=CH-CH=CH-$ 基团；

A 代表间隔基团，其包括作为式 I 所限定的结构中存在的两个吡啶基团之间的连接物的任何二价有机结构，并且特别是具有选自以下的结构的二价分子：



其中 m 、 n 和 p 代表以下数值的整数： $m=0, 1$ ； $n=0, 1-10$ ； $p=0, 1$ ；并且 m 、 n 和 p 不能同时为 0，

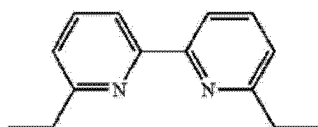
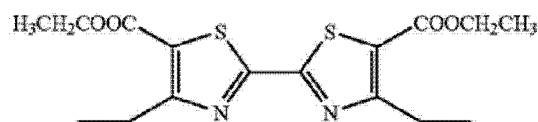
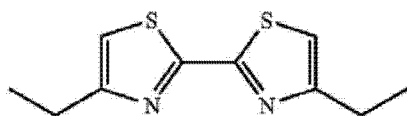


表 1

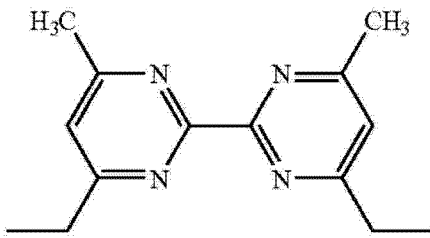
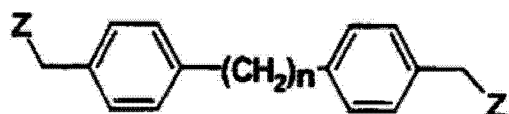
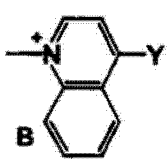
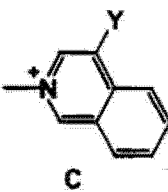
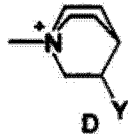
	和 
II	国际专利申请 WO9805644 中描述的化合物，其具有以下通用结构式：  其中 n 为 0、1、2 或 3 Z 是选自以下的任何结构基团：  A  B  C  D 其中 Y 选自 -H、-CH₃、-CH₂-OH、-CO-CH₃、-CN、-NH₂、-N(CH₃)₂、吡咯烷、哌啶、全氢化氮杂卓、-OH、-O-CO-C₁₅H₃₁ 等，

表 2

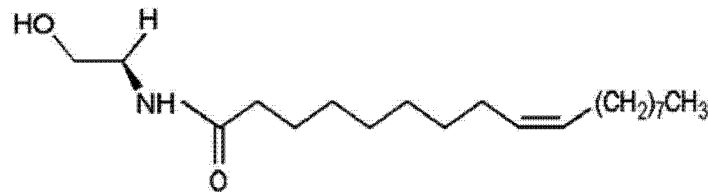
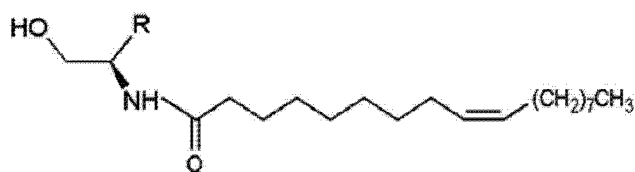
VI	Sugita et al (Biochim.Biophys.Acta, 1975, 398:125-131)所述的 N-油酰乙醇胺(NOE)，其具有以下结构  和如 Grijalvo et al., (Chem.Phys.Lipids, 2006, 144:69-84)所述的它的变体，所述变体具有以下通用结构
----	---

表 2



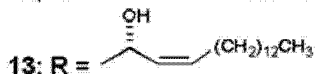
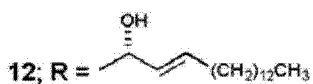
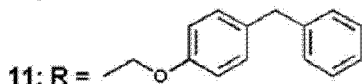
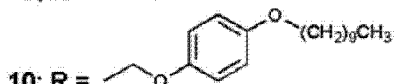
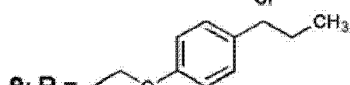
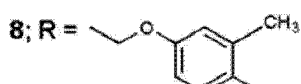
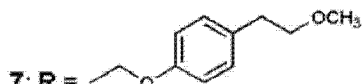
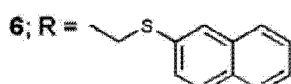
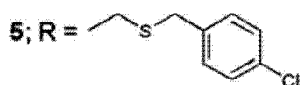
其中 R 选自

1; R = CH₂SCH₂CH₃

2; R = CH₂S(CH₂)₄CH₃

3; R = CH₂S(CH₂)₉CH₃

4; R = CH₂S(CH₂)₁₅CH₃



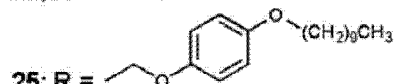
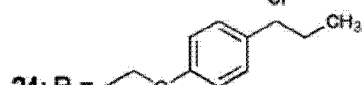
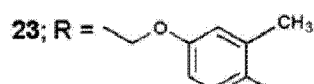
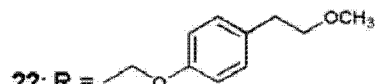
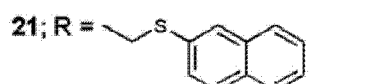
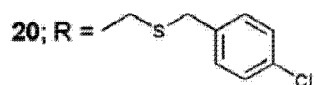
15; R = -(CH₂)₁₅CH₃

16; R = CH₂SCH₂CH₃

17; R = CH₂S(CH₂)₄CH₃

18; R = CH₂S(CH₂)₉CH₃

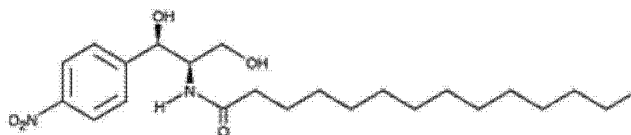
19; R = CH₂S(CH₂)₁₅CH₃



VIII

如 Selzner et al (Cancer Res., 2001, 61:1233-1240)所述的 (1R,2R)-N-肉豆蔻酰氨基-4'-硝基-苯丙二醇-1,3 (B13) (D-NMAPPD), 其具有以下结构

表 2



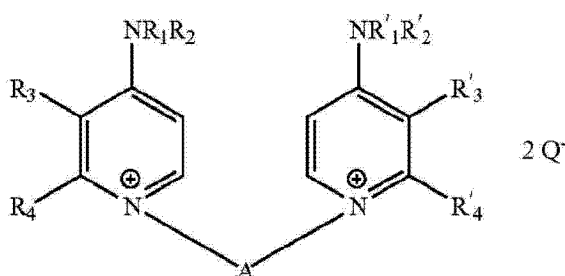
及其类似物

7. 如权利要求 6 所述的用途, 其中所述样品是肿瘤样品。

8. 第一组分和第二组分在制备治疗癌症的药物组合物中的用途, 所述第一组分包含一种或多种特异性针对胆碱激酶 α 异形体的胆碱激酶抑制剂, 其中所述胆碱激酶抑制剂选自以下的表 1 中的 I 和 II 的化合物, 并且所述第二组分选自 (i) 一种或多种酸性神经酰胺酶抑制剂, 其中所述酸性神经酰胺酶抑制剂选自以下的表 2 中的 VI 和 VIII 的化合物; (ii) 一种或多种化疗剂, 其中所述化疗剂选自顺铂和 5- 氟尿嘧啶; 和 (iii) 一种或多种死亡受体配体, 其中所述死亡受体配体为 TRAIL,

表 1

I 美国专利申请 US20070185170 中所描述的化合物, 该化合物具有以下通式:



其中

Q⁻代表药学上合适的有机或无机酸的共轭碱;

R₁ 和 R'₁ 彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、C₁₋₆ 烷基、氨基或烷氧基取代的芳基;

R₂ 和 R'₂ 彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、C₁₋₆ 烷基、氨基或烷氧基取代的芳基;

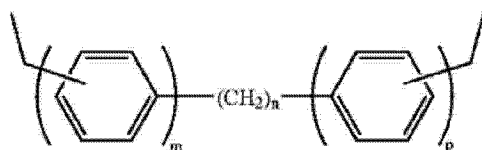
R₃ 和 R'₃ 或彼此独立地代表选自 H、卤素、三氟甲基、羟基、氨基、烷氧基和任选地被三氟甲基、羟基、氨基或烷氧基取代的 C₁₋₆ 烷基

表 1

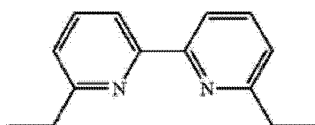
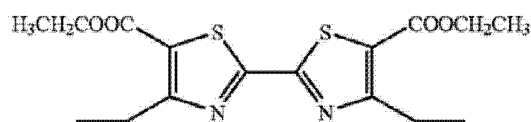
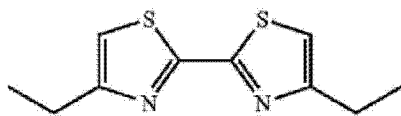
的基团，或与 R_4 和 R'_4 一起分别并彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 基团；

R_4 和 R'_4 或彼此独立地代表选自 H 和任选地被卤素、三氟甲基、羟基、氨基或烷氧基取代的 C_{1-6} 烷基的基团，或与 R_3 和 R'_3 一起分别并彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ 基团；

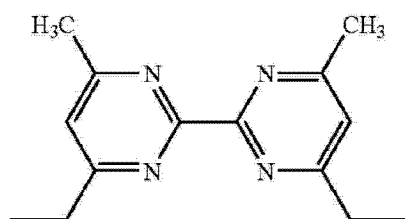
A 代表间隔基团，其包括作为式 I 所限定的结构中存在的两个吡啶基团之间的连接物的任何二价有机结构，并且特别是具有选自以下的结构的二价分子：



其中 m 、 n 和 p 代表以下数值的整数： $m=0, 1$ ； $n=0, 1-10$ ； $p=0, 1$ ；并且 m 、 n 和 p 不能同时为 0，



和

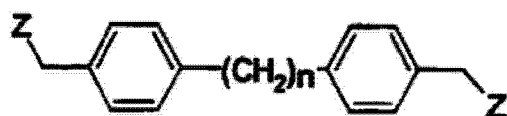


II

国际专利申请 WO9805644 中描述的化合物，其具有以下通用结构

表 1

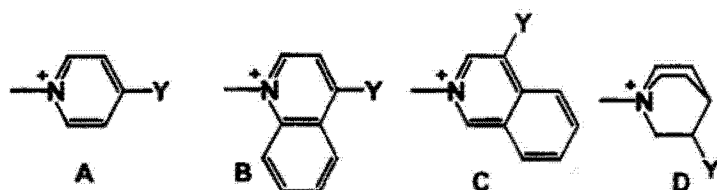
式:



其中

n 为 0、1、2 或 3

Z 是选自以下的任何结构基团:

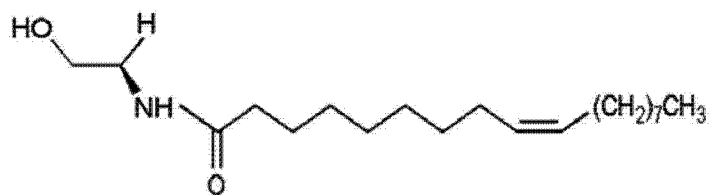


其中 Y 选自 -H、-CH₃、-CH₂-OH、-CO-CH₃、-CN、-NH₂、-N(CH₃)₂、吡咯烷、哌啶、全氢化氮杂卓、-OH、-O-CO-C₁₅H₃₁ 等,

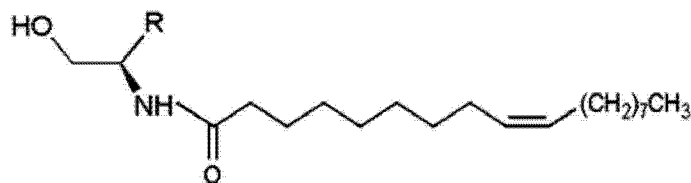
表 2

VI

Sugita et al (Biochim.Biophys.Acta, 1975, 398:125-131)所述的 N-油酰乙醇胺(NOE), 其具有以下结构

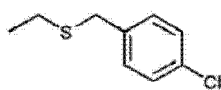
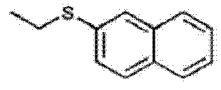
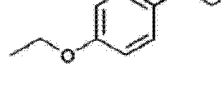
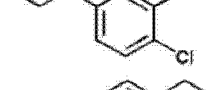
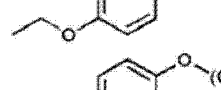
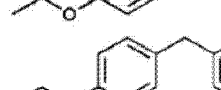
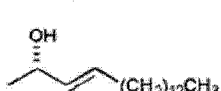
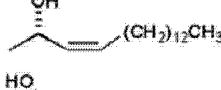
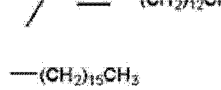
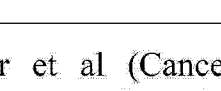
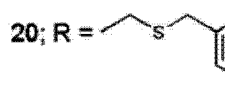
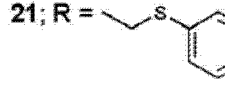
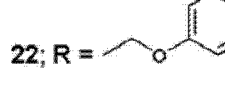
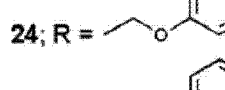
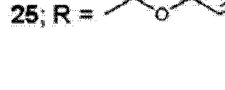
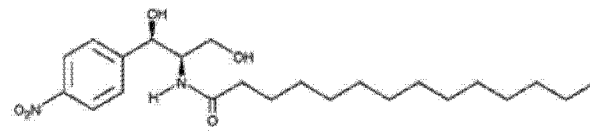


和如 Grijalvo et al., (Chem.Phys.Lipids, 2006, 144:69-84)所述的它的变体, 所述变体具有以下通用结构



其中 R 选自

表 2

表 2	1; R = CH₂SCH₂CH₃ 2; R = CH₂S(CH₂)₄CH₃ 3; R = CH₂S(CH₂)₉CH₃ 4; R = CH₂S(CH₂)₁₅CH₃ 5; R =  6; R =  7; R =  8; R =  9; R =  10; R =  11; R =  12; R =  13; R =  14; R =  15; R = —(CH₂)₁₅CH₃ 16; R = CH₂SCH₂CH₃ 17; R = CH₂S(CH₂)₄CH₃ 18; R = CH₂S(CH₂)₉CH₃ 19; R = CH₂S(CH₂)₁₅CH₃ 20; R =  21; R =  22; R =  23; R =  24; R =  25; R = 
VIII	如 Selzner et al (Cancer Res., 2001, 61:1233-1240)所述的 (1R,2R)-N-肉豆蔻酰氨基-4'-硝基-苯丙二醇-1,3 (B13) (D-NMAPPD), 其具有以下结构  及其类似物

9. 如权利要求 8 所述的用途, 其中所述癌症是非小细胞肺癌或结肠癌。

用于治疗癌症的方法和组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及治疗领域,并且更具体而言,涉及使用含有数种治疗化合物的组合物治疗癌症的领域,所述组合物与单独使用所述化合物相比表现出提高的活性。

[0002] 发明背景

[0003] 胆碱激酶是肯尼迪途径 (Kennedy pathway) 或磷脂酰胆碱 (PC) 合成途径的第一个酶。其作用是使用腺苷 5' - 三磷酸盐 (ATP) 作为磷酸基供体将胆碱磷酸化为磷酸胆碱 (PCho)。Ras 基因构成了所谓的致癌基因家族,已经对其进行了广泛研究,因为它们在所有人类肿瘤中被激活,并且某些 Ras 基因在 90% 的所有人类肿瘤中被激活。由于 Ras 蛋白参与细胞增殖,终末分化和衰老的调节,所以它们在细胞内信号传递中起重要作用。不同致癌基因所介导的转化诱导高胆碱激酶活性水平,其中 ras 致癌基因发挥重要作用,这导致了胆碱激酶的产物 PCho 的细胞内水平的异常增加。其它发现也支持 ChoK 在人类肿瘤产生中的作用。例如,核磁共振 (NMR) 技术已经证实:相对于正常组织,包括乳房、前列腺、脑和卵巢肿瘤在内的某些人类肿瘤组织存在高 PCho 水平。现已公知的是,ras 是人类癌症发生中最深入研究的致癌基因之一,并且 ChoK 抑制已经证实为致癌基因所转化的细胞中新的并且有效的抗肿瘤策略。随后在裸鼠中体内推断了这些初步发现。

[0004] 基于该资料,设计以单独或联合的方式直接影响胆碱激酶活性或磷酸胆碱所活化的酶的化合物将允许有效抗肿瘤治疗的开发。

[0005] 从该角度看,对 ChoK 抑制剂的研究已经将密胆碱 -3 (HC-3) 鉴定为相对有效并且具有选择性的阻断剂 (Cuadrado A., et al., 1993, Oncogene 8 :2959-2968, Jiménez B., et al., 1995, J. Cell Biochem. 57 :141-149 ;Hernández-Alcoceba, R. et al., 1997, Oncogene, 15 :2289-2301)。该具有联苯基结构的胆碱同系物已被用于设计新的抗肿瘤药物。然而,由于 HC-3 是有效的呼吸系统麻醉剂,所以 HC-3 不是用于临床实践的好的候选物。基于 HC-3 的结构、通过在该化合物引入结构修饰,已经合成了具有改善的 ChoK 抑制活性和降低的毒性作用的某些衍生物。

[0006] 还已经发现,来源于吡啶鎓的双季铵化对称化合物能够抑制全细胞中 PCho 的产生 (W098/05644)。然而,这些衍生物具有高毒性水平,这限制了其扩展的治疗应用。

[0007] 对于化疗的抗性 (“药物抗性”) 是限制目前癌症治疗中使用的许多化学治疗的有效性的根本问题。药物抗性的发生是由于多种机制,例如增加的药物失活、降低的药物积累、药物从癌细胞流出、化疗诱导的损伤的增强修复、促存活途径的活化和细胞死亡途径的失活 (Hersey P. et al., 2008, Adv Exp Med Biol. 2008 ;615 :105-26)。药物抗性可以是在开始抗肿瘤治疗前肿瘤细胞所固有的。此外,特异性药物抗性机制可以是肿瘤细胞暴露于特定治疗之后才被激活的。鉴定出对固有抗性 or 获得性抗性负有责任的那些分子实体可以提供对于可以用于克服该抗性的潜在分子靶标的有价值的信息。因此,以干扰赋予对于确定的肿瘤特异性治疗的药物抗性的分子组分为目的的设计策略构成了致力于增加癌症治疗功效的重要步骤。

[0008] Mori et al (Cancer Res., 2007, 67 :11284-11290) 已经描述了 ChoK 抑制剂 (胆

碱激酶特异性 siRNA) 和 5- 氟尿嘧啶的联合使用导致对于降低乳腺癌细胞的细胞增殖 / 活力的协同效应。然而, 该治疗依赖于使用 siRNA, 而 siRNA 在体内并未以有效方式转运至靶细胞内。此外, 为此目的而设计的 siRNA 同时识别 ChoK α 和 ChoK β (Mori et al., Cancer Res., 2007, 67 :11284-11290), 但是仅 ChoK α 是肿瘤学的分子靶标, ChoK β 并不是肿瘤学的分子靶标 (专利 W02006108905 和共同待决的西班牙专利申请 P200800416), 这质疑了该策略的潜在治疗用途。

[0009] 尽管如此, 仍然非常需要开发提供 ChoK 酶的高抑制活性的化合物, 以允许将其用于肿瘤治疗, 同时, 相对于现有技术中的化合物, 所述化合物应当大大降低其毒性。

[0010] 发明概述

[0011] 在第一方面, 本发明涉及组合物, 所述组合物分开包含或合在一起地包含第一组分和第二组分, 所述第一组分包含一种或多种胆碱激酶抑制剂, 所述第二组分选自一种或多种酸性神经酰胺酶抑制剂、一种或多种化疗剂和一种或多种死亡受体配体。

[0012] 在第二方面, 本发明涉及包含本发明的组合物与药学可接受的载体或赋形剂的药物组合物, 并且涉及所述药物组合物在医药中并特别是在治疗癌症中的用途。

[0013] 在另一方面, 本发明涉及酸性神经酰胺酶抑制剂、化疗剂或死亡受体配体在增加肿瘤细胞对于胆碱激酶抑制剂的敏感性中的用途。

[0014] 在仍然另一方面, 本发明涉及鉴定对 ChoK 抑制剂治疗具有抗性的癌症患者的方法, 所述方法包括测定来自所述患者的样品中酸性神经酰胺酶的水平, 其中当所述样品中酸性神经酰胺酶的水平高于参考样品时, 所述患者被鉴定为对 ChoK 抑制剂具有抗性。

[0015] 在另一方面, 本发明涉及为癌症患者选择个体化治疗的方法, 所述方法包括测定来自所述患者的样品中酸性神经酰胺酶的水平, 其中如果所述样品中酸性神经酰胺酶的表达水平高于参考样品, 则将该患者候选用 ChoK 抑制剂和酸性神经酰胺酶抑制剂的组合进行治疗。

[0016] 在仍然另一方面, 本发明涉及鉴定能够增加 ChoK 抑制剂在治疗癌症中的治疗效果的化合物的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0017] (i) 使表现出对 ChoK 抑制剂的抗性的肿瘤细胞与候选化合物接触; 以及

[0018] (ii) 测定所述细胞中酸性神经酰胺酶的水平;

[0019] 其中如果用候选化合物处理后的细胞中酸性神经酰胺酶的水平低于处理前, 则所述候选化合物被认为能够增加 ChoK 抑制剂在治疗癌症中的效果。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1. NSCLC 患者的肿瘤原代培养物中对于 MN58b 处理的反应。

[0022] 图 2. 对通过 RT-qPCR 的微阵列分析结果的验证。

[0023] 图 3. 对于 NSCLC 中 ChoK 抑制的抗性机制所提出的模型。

[0024] 图 4. 通过 RT-qPCR 测定的来源于人肺癌的不同细胞系中 ASAH1 和 ChoK 的水平。

[0025] 图 5. 对 ChoK 抑制剂具有抗性的细胞 H460 中通过 qRT-PCR 测定的 ASAH1 基因表达和通过 Western 印迹分析测定的酸性神经酰胺酶蛋白表达。

[0026] 图 6. 顺铂 /ChoK 抑制剂的联合相继治疗的协同效应。

[0027] 图 7. NSCLC 异种移植物中顺铂 /ChoK 抑制剂的联合治疗。(A)MN58b/ 顺铂 (统计学显著性 ;MN58b $p = 0.09$;顺铂 $p = 0.3$;相继 $p = 0.017$;同时 $p = 0.016$), (B) NSCLC 异

种移植瘤中的联合治疗 (统计学显著性 ;RSM-932A (932A) $p = 0.157$;顺铂 (DPP) $p = 0.441$;相继 DPP 和 TCd-171 治疗 (SEC) $p = 0.03$) ;(C) 以对照小鼠和用 ChoK 抑制剂 (2mg/Kg)、顺铂 (1mg/Kg) 以及联合治疗组治疗的小鼠的毒性衡量的体重监测 ;(D) 与联合治疗产生相似抗肿瘤活性的单独顺铂导致了毒性的显著增加。

[0028] 图 8. 在标明的细胞系中肿瘤细胞对于胆碱激酶抑制剂 RSM-932A (ChoKI) (A) 或 TRAIL (B) 的敏感性。

[0029] 图 9. ChoKI 和 TRAIL 联合治疗的协同作用。

[0030] 图 10. 结肠癌细胞中 MN58b 和 TRAIL 联合治疗的协同效应。

[0031] 图 11. 通过流式细胞仪分析所测定的结肠癌细胞中 MN58b 和 TRAIL 联合治疗的协同效应。

[0032] 图 12. ChoK 抑制增加 DR5 表达。

[0033] 图 13. ChoKI/TRAIL 联合治疗后的神经酰胺产生。

[0034] 图 14. 结肠异种移植瘤中 ChoKI/TRAIL 的联合治疗。

[0035] 图 15. 结肠癌细胞中 ChoK 抑制剂和 5-FU 联合治疗的协同效应。

[0036] 图 16. 通过流式细胞仪所测定的结肠癌细胞中 ChoK 抑制剂和 5-FU 联合治疗的协同效应。

[0037] 图 17. 结肠异种移植瘤中 ChoKI/5-FU 的联合治疗。

[0038] 发明详述

[0039] ChoK抑制剂和酸性神经酰胺酶抑制剂的组合 (本发明的第一组合物)

[0040] 本发明的发明人已鉴定出对于胆碱激酶 (ChoK) 抑制剂具有抗性的 原代人肿瘤的存在 (图 1)。具体而言,本发明的实施例 1 描述了来源于人非小细胞肺癌组织的不同原代培养物表现出对于已知 ChoK 抑制剂 MN58b 的有差异的敏感性 (图 1)。出人意料的是,正如本发明的实施例 2 和 3 所示 (图 2),发现这种抗性是由酸性神经酰胺酶表达水平的增加所造成。ChoK 的功能是将 Cho 磷酸化,从而产生磷酸胆碱 (Pcho),磷酸胆碱 (Pcho) 是质膜的主要组分磷脂酰胆碱 (PC) 的前体 (Lacal JC., IDrugs. 2001 ;4 :419-26)。然而,细胞增殖必然需要膜,并因此必然需要 PC。因此,不希望被任何理论所束缚,我们相信肿瘤细胞响应于 ChoK 抑制是通过备选途径的激活从而通过鞘磷脂 (SM) 的降解而产生 PCho (图 3)。然而,SM 的切割不仅造成 PCho 的产生,还造成促凋亡的神经酰胺的产生,这导致了肿瘤细胞参与凋亡性细胞死亡。有趣的是,本文已经发现对于 ChoK 抑制具有抗性的那些细胞表现出增加的酸性神经酰胺酶水平,酸性神经酰胺酶是促进促凋亡的神经酰胺转变为促有丝分裂的鞘氨醇-1P 的酶 (图 3)。这些结果提示酸性神经酰胺酶的表达可以通过降低细胞内神经酰胺水平来抑制 ChoK 抑制所介导的细胞死亡的促进作用。因此,酸性神经酰胺酶的表达使肿瘤细胞中 ChoK 抑制所触发的促凋亡信号失活。此外,产生的神经酰胺可以被转变为促有丝分裂的鞘氨醇-1P (图 3)。

[0041] 该发现提供了通过同时给予酸性神经酰胺酶抑制剂来增加对 ChoK 抑制剂的敏感性而实现改进的癌症治疗的可能性。事实上,本申请的实施例 4 证实,使用酸性神经酰胺酶抑制剂 NOE 处理 NSCLS 来源的肿瘤细胞导致了 ChoK 抑制剂的增加的敏感性。此外,与单独使用抑制剂或联合使用 ChoK 抑制剂和碱性神经酰胺酶的特异性抑制剂相比,ChoK 抑制剂 MN58b 或 RSM-932A 和酸性神经酰胺酶抑制剂 D-NMAPPD 的联合使用得到了提高的抗肿瘤

效果（参见实施例 4）。按照此方式，酸性神经酰胺酶抑制剂和 ChoK 抑制剂的联合给药将允许使用较低剂量的 ChoK 抑制剂，从而产生较小的不良副作用。

[0042] 因此，在第一方面，本发明提供组合物（下文中的本发明第一组合物）所述组合物包含第一组分或第二组分、或者包含第一组分和第二组分，所述第一组分包含一种或多种胆碱激酶抑制剂，所述第二组分包含一种或多种酸性神经酰胺酶抑制剂。

[0043] 术语“组合物”是指按照本发明的可选实施方案的一种或多种化合物的不同组合。优选地，所述组合物包含至少一种酸性神经酰胺酶抑制剂和至少一种 ChoK 抑制剂。

[0044] 如本文所用的胆碱激酶是指在 ATP 的存在下催化胆碱的磷酸化作用而产生磷酸胆碱 (PCho) 的酶 (EC 2.7.1.32)。示例性的按照本发明可以被抑制的胆碱激酶包括胆碱激酶 α （如 UniProt 所限定的，人、小鼠和大鼠蛋白的登录号分别为 P35790、054804 和 Q01134）。

[0045] 如本文所用的酸性神经酰胺酶 (N- 酰基鞘氨醇脱酰酶活性, EC 3.5.1.23) 是负责在溶酶体中将神经酰胺降解为鞘氨醇和游离脂肪酸的脂质水解酶。细胞含有至少三种神经酰胺酶，所述三种神经酰胺酶是按照其活性和定位的最适 pH 进行分类 (Li CM. et al., Genomics, 1999, 62 :223-31)，分为酸性神经酰胺酶 (ASA1, NM_177924.3 或 Q13510)、中性神经酰胺酶 (ASA2, NM_019893 或 Q9NR71) 和碱性神经酰胺酶 (ASA3, NM_133492, Q8TDN7 或 Q5QJU3)。已经也有对于第二酸性神经酰胺酶（称为酸性神经酰胺酶样蛋白或 ASAHL）多肽的描述 (UniProt 登录号 Q02083)。本发明中所使用的抑制剂为至少抑制酸性神经酰胺酶和 / 或酸性神经酰胺酶样蛋白的那些抑制剂，因为在对 ChoK 抑制剂具有抗性的细胞中，其它两种神经酰胺酶都未表现出表达的显著增加。

[0046] 在某些人类癌症中，酸性神经酰胺酶活性异常表达。这种酶可被用作癌症的新靶点，并且可以参与抗癌治疗抗性（参见 Ian RS., Genes Chromosomes Cancer. 2000, 29 :137-46 ;Liu X., Front Biosci. 2008 ;13 :2293-8 和 Morales A., Oncogene. 2007, 26 : 905-16）。

[0047] 胆碱激酶抑制剂

[0048] 如本文所用的胆碱激酶抑制剂涉及能够导致 ChoK 活性降低的任何化合物，包括阻止 ChoK 基因表达从而导致 ChoK mRNA 或蛋白水平降低的那些化合物以及抑制 ChoK 导致该酶的活性降低的化合物。

[0049] 在优选实施方案中，所述胆碱激酶抑制剂对于胆碱激酶 α 是特异性的。

[0050] 可以使用测定 mRNA 表达水平的标准检测鉴定导致 ChoK mRNA 水平降低的化合物，所述检测例如 RT-PCR、RNA 保护分析、Northern 印迹、原位杂交、微阵列技术等。

[0051] 可以使用测定蛋白表达水平的标准检测鉴定导致 ChoK 蛋白水平降低的化合物，所述检测例如 Western 印迹或 Western 转移、ELISA（酶联免疫吸附测定）、RIA（放射性免疫测定）、竞争性 EIA（竞争性酶学免疫测定）、DAS-ELISA（双抗体夹心 ELISA）、免疫细胞化学和免疫组织化学技术、基于使用包含特异性抗体的蛋白生物芯片或微阵列的技术、或基于胶体沉淀的、以诸如试纸的形式的检测。

[0052] 使用测量胆碱激酶活性的标准检测来检测对于胆碱激酶生物活性的抑制能力的测定，所述分析例如基于以下的方法：如 EP1710236 所述，在纯化的重组胆碱激酶或富含胆碱激酶的组分的存在下，检测 [14 C] 标记的胆碱被 ATP 的磷酸化作用，然后通过使用标准分

析技术（例如 TLC）检测磷酸化的胆碱。

[0053] 如果化合物对于胆碱激酶 α (ChoK α) 是特异性的,则可以通过使用对于 ChoK α 是特异性的并且在严格条件下不会与其它 ChoK 异形体（例如, ChoK β ）杂交的探针检测 ChoK α mRNA 水平的降低或通过使用对于 ChoK α 是特异性的并且不会结合其它 ChoK 异形体（例如, ChoK β ）的抗体检测 ChoK α 蛋白水平的降低来鉴定这些化合物。适于 ChoK α mRNA 和 ChoK α 蛋白水平的特异性测定的试剂在 W02006108905 中已有详细描述。

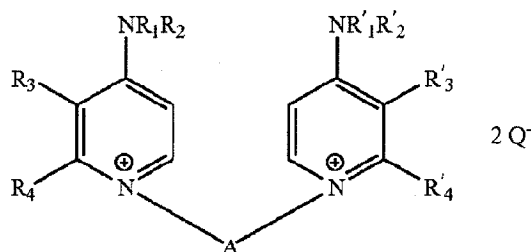
[0054] 表 1 的 I 至 XVIII 中描述了可以用于本发明第一组合物的示例性的胆碱激酶抑制剂。

[0055]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂	
I	美国专利申请 US20070185170 中所描述的化合物, 该化合物具有以下通式:

[0056]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂



其中

Q^- 代表药学上合适的有机或无机酸的共轭碱;

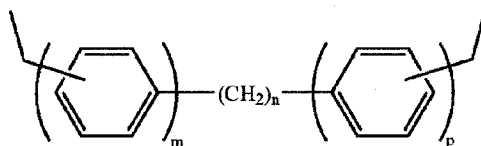
R_1 和 R'_1 彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的芳基;

R_2 和 R'_2 彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的芳基;

R_3 和 R'_3 或彼此独立地代表选自 H、卤素、三氟甲基、羟基、氨基、烷氧基和任选地被三氟甲基、羟基、氨基或烷氧基取代的 C_{1-6} 烷基的基团, 或与 R_4 和 R'_4 一起分别并彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的 $-CH=CH-CH=CH-$ 基团;

R_4 和 R'_4 或彼此独立地代表选自 H 和任选地被卤素、三氟甲基、羟基、氨基或烷氧基取代的 C_{1-6} 烷基的基团, 或与 R_3 和 R'_3 一起分别并彼此独立地代表任选地被卤素、三氟甲基、羟基、 C_{1-6} 烷基、氨基或烷氧基取代的 $-CH=CH-CH=CH-$ 基团;

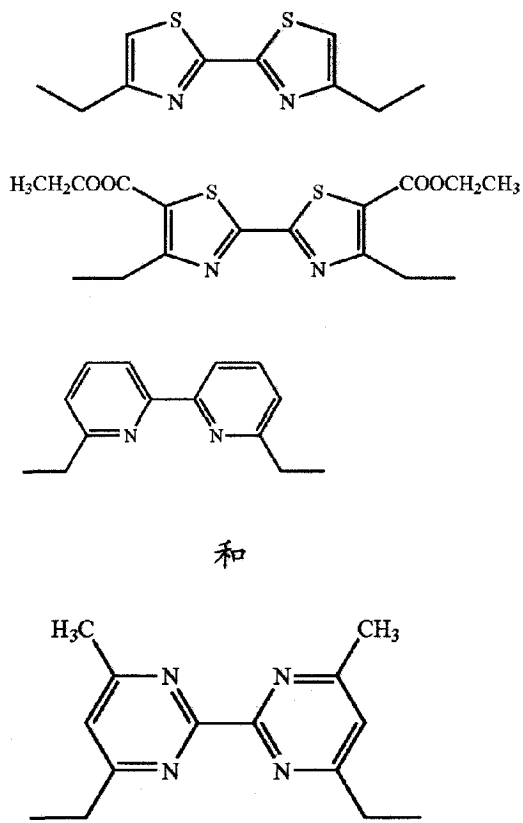
A 代表间隔基团, 其包括作为式 I 所限定的结构中存在的两个吡啶基团之间的连接物的任何二价有机结构, 并且特别是具有选自以下的结构的二价分子:



其中 m 、 n 和 p 代表以下数值的整数: $m=0, 1$; $n=0, 1-10$; $p=0, 1$; 并且 m 、 n 和 p 不能同时为 0。

[0057]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂

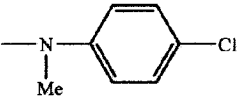
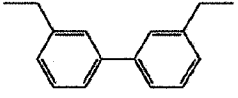
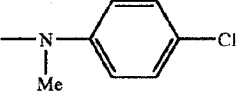
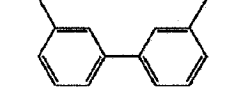
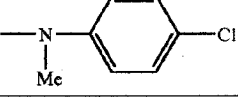
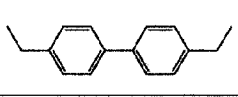
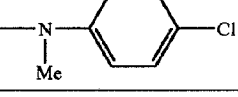
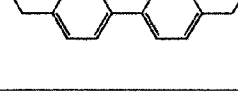
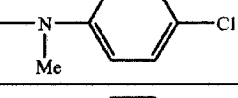
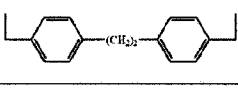
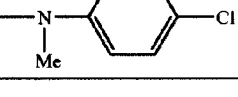
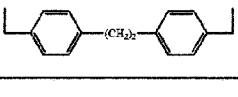


该组中的优选化合物包括取代基 NR_1R_2 、 R_3 、 R_4 和 A 为以下的那些化合物:

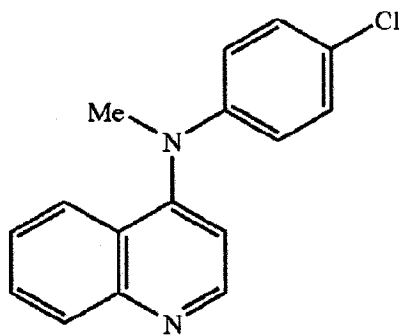
化合物	R_3 、 R_4	NR_1R_2	A
1	H、H		
2	H、H		
3	H、H		
4	H、H		

[0058]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

5	$-(\text{CH}=\text{CH})_2-$		
6	$-\text{C}^5\text{H}=\text{C}^6\text{H}-$ $\text{C}^7\text{Cl}=\text{C}^8\text{H}-$		
7 RSM932 -A	$-(\text{CH}=\text{CH})_2-$		
8	$-\text{C}^5\text{H}=\text{C}^6\text{H}-$ $\text{C}^7\text{Cl}=\text{C}^8\text{H}-$		
9	$-(\text{CH}=\text{CH})_2-$		
10	$-\text{C}^5\text{H}=\text{C}^6\text{H}-$ $\text{C}^7\text{Cl}=\text{C}^8\text{H}-$		

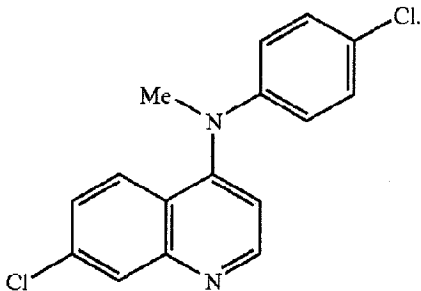
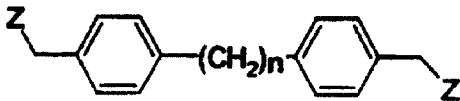
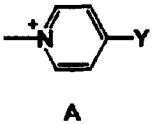
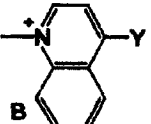
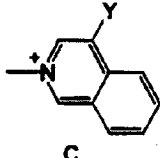
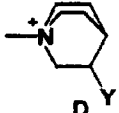
该组中的优选化合物包括分别具有下述结构的 4-(4-氯-N-甲基苯胺基)喹啉和 7-氯-4-(4-氯-N-甲基氨基)喹啉:



和

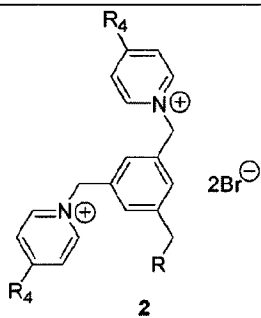
[0059]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

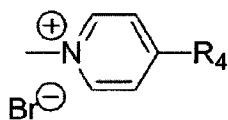
	
II	国际专利申请 WO9805644 中描述的化合物, 其具有以下通用结构式:  其中 n 为 0、1、2 或 3 Z 是选自以下的任何结构基团:  A  B  C  D 其中 Y 选自 -H、-CH₃、-CH₂-OH、-CO-CH₃、-CN、-NH₂、-N(CH₃)₂、吡咯烷、哌啶、全氢化氮杂卓(perhydroazepine)、-OH、-O-CO-C₁₅H₃₁ 等。 优选的具有上文限定的结构式的 ChoK 抑制剂是如 Conejo-García et al (J.Med.Chem., 2003, 46:3754-3757)所述的化合物 1 至 6, 所述化合物具有以下结构:

[0060]

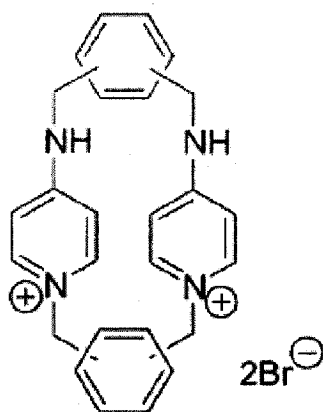
表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂



其中 R 是 H 或



以及



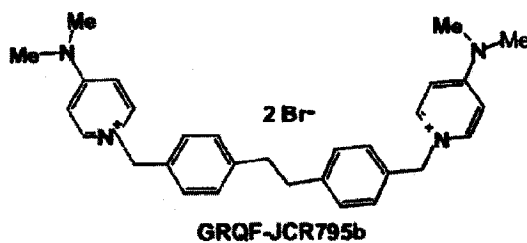
化合物

3
4
5
6

异构体

p,p
m,m
p,m
m,p

符合以上通式的化合物选自具有以下结构的 GRQF-JCR795b、GRQF-MN94b 和 GRQF-MN58b:



[0061]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂

	2 Br⁻ GRQF-MN94b 和 2 Br⁻ GRQF-MN58b
III	国际专利申请 WO9805644 中所述的化合物, 所述化合物具有以下通用结构式 其中n为0、1、2、3等; X为选自以下A、B、C、D和E的结构单元 A B C D E

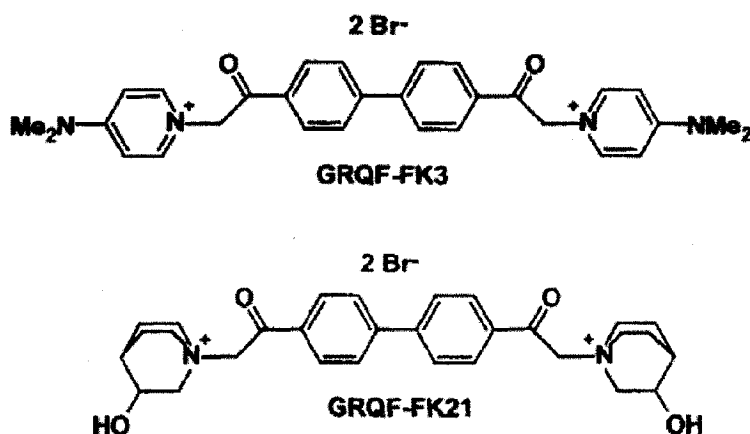
[0062]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

其中Y选自-H、-CH₃、-CH₂-OH、-CO-CH₃、-CN、-NH₂、-N(CH₃)₂、吡咯烷、哌啶、全氢化氮杂卓、-OH、-O-CO-C₁₅H₃₁

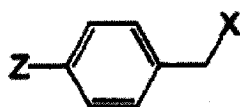
并且, 其中R₁、R₂和R₃是诸如-Me和-Et等的烷基, 但是在某些情况下, R₂和R₃可以是更复杂的基团, 例如-CH₂-CH(OMe)₂和-CH₂-CH(OEt)₂。

优选的具有以上通用结构的化合物为具有以下结构的GRQF-FK3和GRQF-FK21:

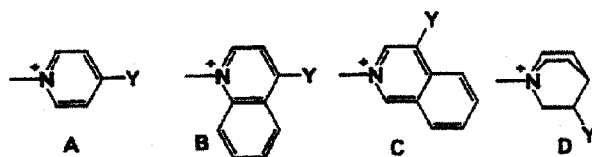


IV

国际专利申请 WO9805644 中所述的化合物, 所述化合物具有以下通用结构式:



其中 X 是选自以下 A、B、C 和 D 的基团:



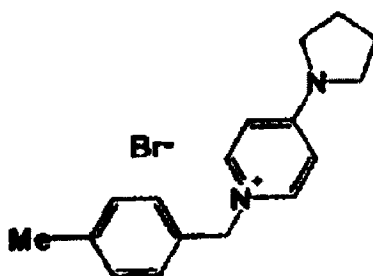
其中Y是诸如-H、-CH₃、-CH₂OH、-CN、-NH₂、-N(CH₃)₂、吡咯烷基、哌啶基、全氢化氮杂卓、-OH、-O-CO-C₁₅H₃₁等的取代基

其中 Z 是烷基(-Me、-Et 等)、芳基、苯基、或例如-OMe、-NH₂、-NMe₂ 等的给电子基团

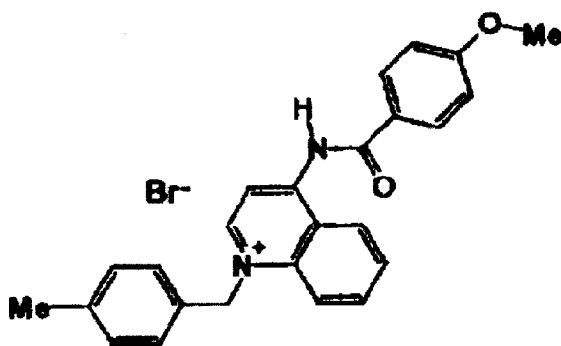
[0063]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

优选的具有以上通用结构的化合物为具有以下结构的 GRQF-MN98b 和 GRQF-MN164b:



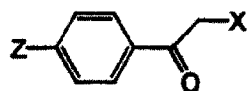
GRQF-MN98b



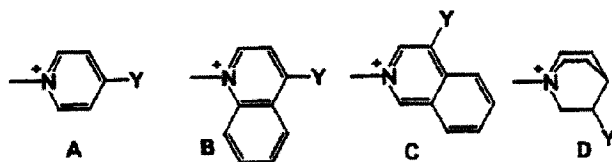
GRQF-MN164b

V

国际专利申请 WO9805644 中所述的化合物, 所述化合物具有以下通用结构式:



其中 X 是选自以下 A、B、C 和 D 的基团



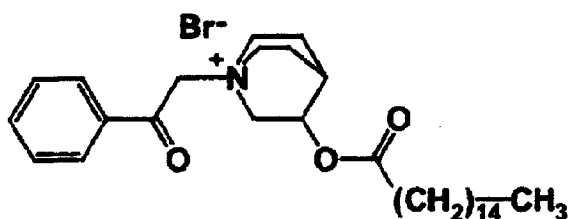
其中 Y 是诸如 -H、-CH₃、-CH₂OH、-CO-CH₃、-CN、-NH₂、-N(CH₃)₂ 的取代基

[0064]

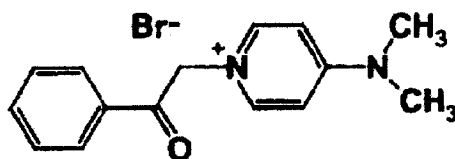
表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

其中 Z 是烷基(-Me、-Et 等)、芳基(苯基等)、或诸如-OMe、-NH₂、-NMe₂ 等的给电子基团

优选的具有以上结构的化合物是具有以下结构的 GRQF-FK29 和 GRQF-FK33:



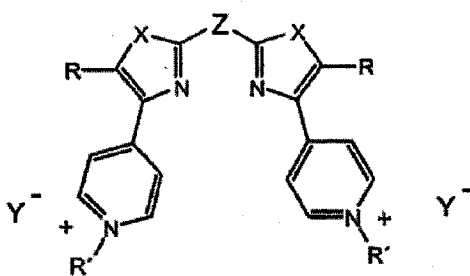
GRQF-FK29



GRQF-FK33

VI

国际专利申请 WO2004016622 中所述的化合物, 所述化合物具有以下通用结构式:



其中 X 是氧或硫,

Z 是单键、1,2-亚乙基、异亚丙基、*p,p'*-联苯基、*p*-苯基、*m*-苯基、2,6-吡啶并、*p,p'*-氧基联苯基(oxydiphenyl)或 *p,p'*-六氟异亚丙基联

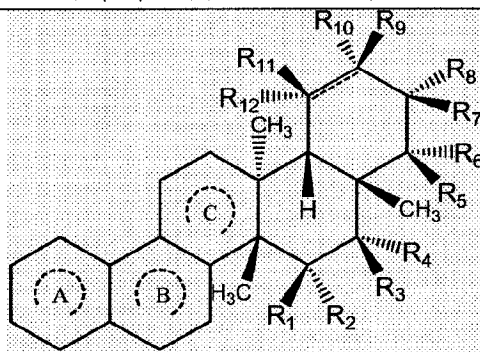
[0065]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

	苯基; R是H、烷基、亚烷基、炔基、芳基、卤素、醇、硫醇、醚、硫醚、亚砷、砷、伯胺或取代胺、硝基、醛、酮、腈、羧酸及其衍生物和硫酸盐、甲烷磺酸盐、盐酸盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、棕榈酸盐、草酸盐、丙二酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐、苯甲酸盐, R'是H或烷基 Y是H或硫酸盐、甲烷磺酸盐、盐酸盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、棕榈酸盐、草酸盐、丙二酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐或苯甲酸盐。 在优选实施方案中, 具有上文限定的结构的化合物选自 2,2-双[(5-甲基-4-(4-吡啶基)-2-噁唑基)]丙烷、2,2-双[(5-三氟甲基-4-(4-吡啶基)-2-噁唑基)]丙烷、4,4'-双[(5-三氟甲基-4-(1-甲基-4-吡啶鎓)-2-噁唑基)]联苯基、4,4'-双[(5-五氟乙基-4-(1-甲基-4-吡啶鎓)-2-噁唑基)]联苯基、4,4'-双[(5-三氟甲基-4-(1-甲基-4-吡啶鎓)-2-噁唑基)]六氟异亚丙基联苯基、2,2-双[(5-三氟甲基-4-(4-吡啶基)-2-噁唑基)]丙烷和 4,4'-双[(5-三氟甲基-4-(1-甲基-4-吡啶鎓)-2-噁唑基)]-1,1'-氧双苯。
VII	如 Cuadrado et al (Oncogene, 1993, 8:2959-2968)和 Jimenez et al (J.Cell Biochem., 57:141-149) 以及 Hernandez-Alcoceba, et al (Oncogene, 1997, 15:2289-2301)所述的密胆碱-3。
VIII	国际专利申请 WO2007077203 中所限定的化合物, 所述化合物具有以下通用结构式:

[0066]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

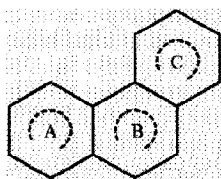


其中

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{12} 独立地为氢、羟基、卤素、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、 $N(R')(R'')$ 氨基, 其中 R' 和 R'' 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基、 $OCOR$ 基团, 其中 R 是 $(CH_2)_2-COOH$ 或 $(CH_2)_2CO_2CH_2CH_3$; 或每一对可以与它们所连接的碳一起形成 $(C=O)$ 基团;

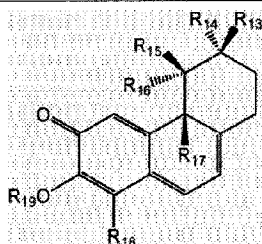
R_9 和 R_{10} 独立地为氢、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、 COR''' 基团(其中 R''' 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、或 $N(R^{IV})(R^V)$ 氨基, 其中 R^{IV} 和 R^V 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基)、 $(CH_2)_n-OH$ 甲醇基(其中 n 是 1-10 的整数)、或共同形成亚甲基;

键 ----- 表示双键或单键; 并且其中三环结构

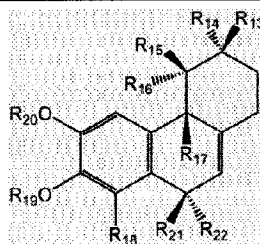


选自以下结构:

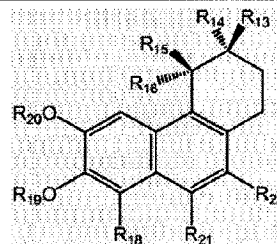
表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂



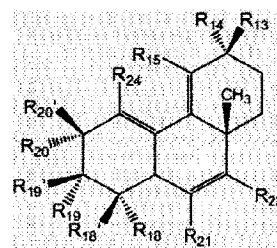
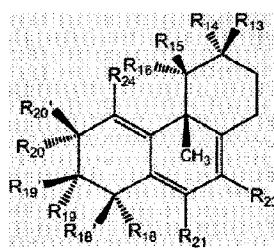
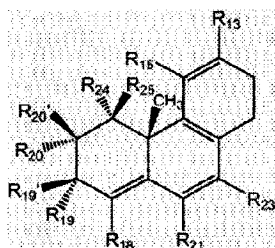
(a)



(b)



(c)



其中

R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{21} 、 R_{22} 和 R_{23} 独立地为氢、羟基、卤素、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、 $N(R^{VI})$ (R^{VII}) 氨基，其中 R^{VI} 和 R^{VII} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基、 $OCOR^{VIII}$ 基团，其中 R^{VIII} 为 $(CH_2)_2COOH$ 或 $(CH_2)_2CO_2CH_2CH_3$ ；或每一对可以与它们所连接的碳一起形成 $(C=O)$ 基团；

R₁₇ 为氢或甲基;

R_{18} 和 R_{18}' 独立地为氢、羟基、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、 COR^{IX} (其中 R^{IX} 为氢、羟基、 C_1 - C_{12} 烷基、 $N(R^X)(R^{XI})$ 氨基, 其中 R^X 和 R^{XI} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基、或 C_1 - C_{12} 烷氧基(alcoxyl)、或三氟甲基;

R_{19} 、 R_{19}' 、 R_{20} 和 R_{20}' 独立地为氢、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 COR^{XII} 基团(其中 R^{XII} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、或 $N(R^{XIII})(R^{XIV})$ 氨基, 其中 R^{XIII} 和 R^{XIV} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基)、 $[(C_1-C_{12})\text{烷基}-O-(C_1-C_{12})\text{烷基}-]$

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂

基团(其中 n 是 1-3 的整数)、三氟甲基、或每对 19-19'或 20-20'可以与它们所连接的碳一起形成 C=O 基团;

R_{24} 和 R_{25} 独立地为氢、羟基或卤素;

优选的符合以上结构的化合物选自:

— 3, 9-二羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-7, 8, 8a, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十氢-6bH, 9H-蒽-2,10-二酮;

— 乙酸 9-羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2, 10 -二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14^a-十四氢-蒽-3-基丙酸酯;

— 9-羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基- 2, 10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十四氢-蒽-3-基丙酸酯;

— 十二烷酸 9-羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2,10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a,12b, 13, 14, 14a-十四氢-蒽-3-基酯;

— 二甲基-氨基甲酸 9-羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2,10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12^a, 12b, 13, 14, 14a-十四氢-蒽-3-基酯;

— 烟酸 9-羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2,10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十四氢-蒽-3-基酯;

— 4-溴(9-羟基-6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2,10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十四氢蒽-3-基) 苯甲酸酯;

— 14-溴-3, 7, 9-三羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-7, 8, 8a, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十氢-6bH, 9H-蒽-2,10-二酮;

— 12-溴-9-羟基-6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2,10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12ar, 12br, 13, 14, 14a-十四氢蒽-3-

[0069]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

基二甲基-氨基甲酸酯;

— 4-溴-(12-溴-9-羟基-6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2,10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十四氢-茚-3-基)苯甲酸酯;

— 12-溴-3, 9-二羟基-6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-7, 8, 8a, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十氢-6bHr 9H-茚-2, 10-二酮;

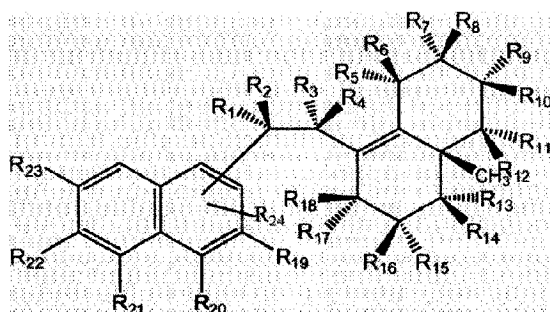
— 3, 9, 10-三羟基-6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十二氢-6bH-茚-2-酮;

— 琥珀酸单-(10-羟基-2, 4a, 6a, 9, 12b, 14a-六甲基-3, 11-二氧代-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 11, 12b, 13, 14, 14a, 14b-十四氢茚-4-基)酯;

— 琥珀酸乙酯 10-羟基-2, 4a, 6a, 9, 12b, 14-六甲基-3, 11-二氧代-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 11, 12b, 13, 14, 14a, 14b-十四氢茚-4-基酯。

IX

国际专利申请 WO2007077203 中所限定的化合物, 所述化合物具有以下通用结构式:



其中

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 、 R_{18} 、 R_{19} 和 R_{20} 独立地为氢、羟基、卤素、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、 $N(R^{XV})(R^{XVI})$ 氨基, 其中 R^{XV} 和 R^{XVI} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基, 或每一对可以与它们所连接的碳一起形成羧基($C=O$)基团;

[0070]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂

R_7 和 R_8 独立地为氢、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、 COR^{XVII} 基团(其中 R^{XVII} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、 O - C_1 - C_{12} 烷基、或 $N(R^{XVIII})(R^{XIX})$ 氨基, 其中 R^{XVIII} 和 R^{XIX} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基)、 $(CH_2)_n$ -OH 甲醇基(其中 n 是 1-10 的整数); 或共同形成亚甲基,

R_{21} 和 R_{24} 独立地为取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 COR^{XX} 基团(其中 R^{XX} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、或 $N(R^{XXI})(R^{XXII})$ 氨基, 其中 R^{XXI} 和 R^{XXII} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基)、 $[(C_1-C_{12})$ 烷基- O -(C_1 - C_{12a}) 烷基-] $_n$ 基团(其中 n 为 1-3)、或三氟甲基;

R_{22} 和 R_{23} 为:

— 氢、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 COR^{XXIII} 基团(其中 R^{XXIII} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、或 $N(R^{XXIV})(R^{XXV})$ 氨基, 其中 R^{XXIV} 和 R^{XXV} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基)、 $[(C_1-C_{12})$ 烷基- O -(C_1 - C_{12a}) 烷基-] $_n$ 基团(其中 n 为 1-3)、或三氟甲基, 当 R_{24} 是 R_{20} 的对位时; 或

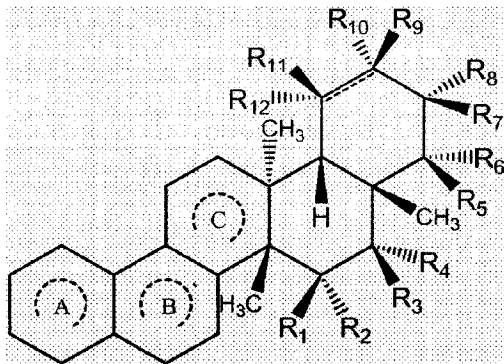
— 分别为 OR_{22}' 和 OR_{23}' , 其中 R_{22}' 和 R_{23}' 独立地为氢、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 COR^{XXVI} 基团(其中 R^{XXVI} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、或 $N(R^{XXVII})(R^{XXVIII})$ 氨基), 其中 R^{XXVII} 和 R^{XXVIII} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基)、 $[(C_1-C_{12})$ 烷基- O -(C_1 - C_{12a}) 烷基-] $_n$ 基团(其中 n 为 1-3)、或三氟甲基, 当 R_{24} 是 R_{20} 的间位时。

优选的符合以上结构的化合物选自:

— 14-溴-3-羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-7, 8, 8a, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十氢-6bH, 9H-茚-2,10-二酮;

[0071]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

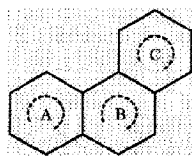
	— 4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2, 10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十四氢莰-3-基乙酸酯; — 4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-2,10-二氧代-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十四氢莰-3-基烟酸酯; — 3, 10-二羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-十二氢-6bH 莰-2-酮; — 3-羟基-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-六甲基-7, 8, 8a, 12a, 12b, 13, 14, 14a-八氢-6bH, 9H-莰-2, 10-二酮
X	国际专利申请 WO2007077203 中所限定的化合物, 所述化合物具有以下通用结构式:  其中 R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_{11} 和 R_{12} 独立地为氢、羟基、卤素、取代的或未取代的 C_1-C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6-C_{10} 芳基、$N(R')(R'')$ 氨基, 其中 R' 和 R'' 独立地为氢或 C_1-C_{12} 烷基、$OCOR$ 基团, 其中 R 是 $(CH_2)_2-COOH$ 或 $(CH_2)_2CO_2CH_2CH_3$; 或每一对可以与它们所连接的碳一起形成 $(C=O)$ 基团; R_9 和 R_{10} 独立地为氢、取代的或未取代的 C_1-C_{12} 烷基、C_6-C_{10} 芳基、COR''' 基团(其中 R''' 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1-C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6-C_{10} 芳基、$O-C_1$-C_{12} 烷基、或 $N(R^{IV})(R^V)$ 氨基, 其中 R^{IV} 和 R^V 独立地为氢或 C_1-C_{12} 烷基)、$(CH_2)_n-OH$ 甲基(其

[0072]

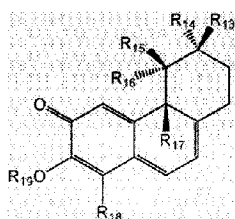
表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱酯酶抑制剂

中 n 是 1-10 的整数); 或共同形成亚甲基;

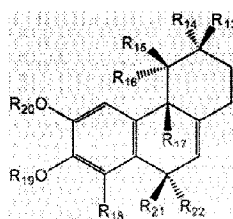
键 $\text{---}\text{---}\text{---}$ 表示双键或单键; 并且其中三环结构



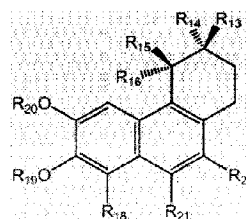
选自以下结构:



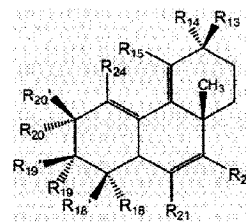
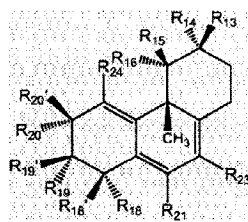
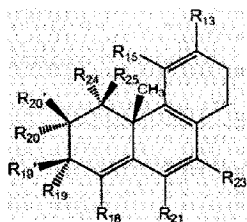
(a)



(b)



(c)



其中

R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{21} 、 R_{22} 和 R_{23} 独立地为氢、羟基、卤素、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、 $N(R^{VI})$ (R^{VII}) 氨基, 其中 R^{VI} 和 R^{VII} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基、 $OCOR^{VIII}$ 基团, 其中 R^{VIII} 为 $(CH_2)_2COOH$ 或 $(CH_2)_2CO_2CH_2CH_3$; 或每一对可以与它们所连接的碳一起形成 $(C=O)$ 基团;

R_{17} 为氢或甲基;

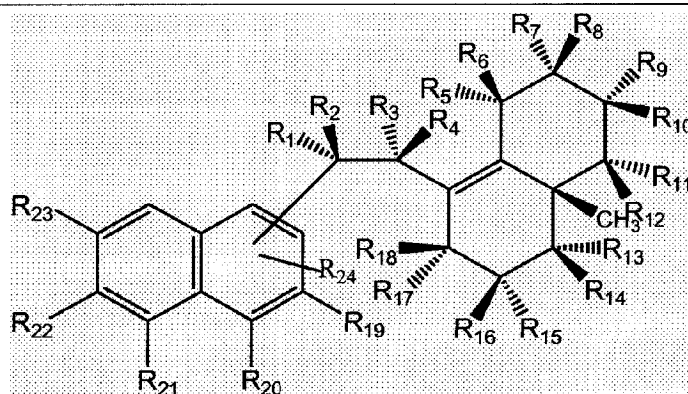
R_{18} 和 R_{18}' 独立地为氢、羟基、卤素、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、

[0073]

	表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂
	COR^{IX} (其中 R^{IX} 为氢、羟基、$\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基、$\text{N}(\text{R}^{\text{X}})(\text{R}^{\text{XI}})$ 氨基, 其中 R^{X} 和 R^{XI} 独立地为氢或 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基、或 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷氧基)、或三氟甲基; R_{19}、R_{19}'、R_{20} 和 R_{20}' 独立地为氢、取代的或未取代的 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基、COR^{XII} 基团(其中 R^{XII} 为氢、羟基、取代的或未取代的 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基、取代的或未取代的 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基、或 $\text{N}(\text{R}^{\text{XIII}})(\text{R}^{\text{XIV}})$ 氨基, 其中 R^{XIII} 和 R^{XIV} 独立地为氢或 $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ 烷基)、$[(\text{C}_1\text{-C}_{12})\text{烷基-O-}(\text{C}_1\text{-C}_{12})\text{烷基}]_n$ 基团(其中 n 为 1-3)、三氟甲基; 或每对 19-19' 或 20-20' 可以与它们所连接的碳一起形成 C=O 基团; R_{24} 和 R_{25} 独立地为氢、羟基或卤素; 优选的符合以上结构的化合物选自: — 7, 10, 11-三羟基-2, 4a, 6a, 9, 12b, 14a-六甲基-8-氧代-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 8, 12b, 13, 14, 14a, 14b-十四氢-茚-2-羧酸甲酯; — 9-甲酸基-10, 11-二羟基-2, 4a, 6a, 12b, 14a-五甲基-8-氧代-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 8, 12b, 13, 14, 14a, 14b-十四氢-茚-2-羧酸甲酯; — 11-羟基-10-(2-甲氧基-乙氧基甲氧基)-2, 4a, 6a, 9, 12b, 14a-六甲基-8-氧代-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 8, 12b, 13, 14, 14a, 14b-十四氢-茚-2-羧酸甲酯。
XI	国际专利申请 WO2007077203 中所限定的化合物, 所述化合物具有以下通用结构式:

[0074]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂



R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 、 R_{18} 、 R_{19} 和 R_{20} 独立地为氢、羟基、卤素、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、 $N(R^{XV})(R^{XVI})$ 氨基，其中 R^{XV} 和 R^{XVI} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基；或每对可以与它们所连接的碳一起形成羧基($C=O$)基团；

R_7 和 R_8 独立地为氢、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 C_6 - C_{10} 芳基、 COR^{XVII} 基团(其中 R^{XVII} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、 O - C_1 - C_{12} 烷基、或 $N(R^{XVIII})(R^{XIX})$ 氨基，其中 R^{XVIII} 和 R^{XIX} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基)、 $(CH_2)_n$ -OH 甲醇基(其中 n 是 1-10 的整数)；或共同形成亚甲基，

R_{21} 和 R_{24} 独立地为取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 COR^{XX} 基团(其中 R^{XX} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、或 $N(R^{XXI})(R^{XXII})$ 氨基，其中 R^{XXI} 和 R^{XXII} 独立地为氢或 C_1 - C_{12} 烷基)、 $[(C_1-C_{12})\text{烷基}-O-(C_1-C_{12a})\text{烷基-}]_n$ 基团(其中 n 为 1-3)、或三氟甲基；

R_{22} 和 R_{23} 为：

— 氢、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、 COR^{XXIII} 基团(其中 R^{XXIII} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6 - C_{10} 芳基、或 $N(R^{XXIV})(R^{XXV})$ 氨基，其中 R^{XXIV}

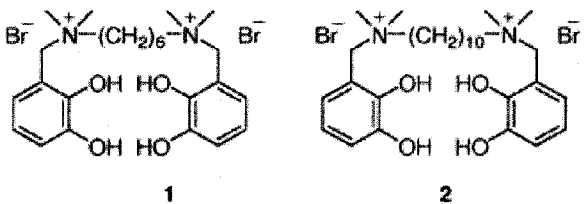
[0075]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂

	和 R^{XXV} 独立地为氢或 C_1-C_{12} 烷基)、$[(C_1-C_{12})\text{烷基}-O-(C_1-C_{12a})\text{烷基-}]_n$ 基团(其中 n 为 1-3)、或三氟甲基, 当 R_{24} 是 R_{20} 的对位时; 或 — 分别为 OR_{22}' 和 OR_{23}', 其中 R_{22}' 和 R_{23}' 独立地为氢、取代的或未取代的 C_1-C_{12} 烷基、COR^{XXVI} 基团(其中 R^{XXVI} 为氢、羟基、取代的或未取代的 C_1-C_{12} 烷基、取代的或未取代的 C_6-C_{10} 芳基、或 $N(R^{XXVII})(R^{XXVIII})$ 氨基, 其中 R^{XXVII} 和 R^{XXVIII} 独立地为氢或 C_1-C_{12} 烷基)、$[(C_1-C_{12})\text{烷基}-O-(C_1-C_{12a})\text{烷基-}]_n$ 基团(其中 n 为 1-3)、或三氟甲基, 当 R_{24} 是 R_{20} 的间位时。 优选的符合以上结构的化合物选自: — 10, 11-二羟基-2, 4a, 6a, 9, 14a-五甲基-1, 4, 4a, 5, 6, 6a, 13, 14, 14a, 14b-十氢-2H-茚-3-酮; — 10, 11-二羟基-2, 4a, 6a, 9, 14a-五甲基-4a, 5, 6, 6a, 13, 14, 14a, 14b-八氢-4H-茚-3-酮。
XII	ATP 类似物, 包括不可水解的 ATP 类似物, 例如 AMP-PCH₂P、腺苷酰亚氨基二磷酸盐(AMP-PNP)、AMP-PSP 和 AMP, 其中连接 ATP 类似物的第二和第三磷酸酯的氧分别被 CH_2、S (例如 ATPγS、ATPβ 和 ATPαS) 和 NH 以及自杀底物, 例如 5'-(p-氟磺酰苯甲酰基)腺苷(FSBA)、N^6-二乙基-β,γ-二溴亚甲基-ATP、2-甲硫基-ATP (APM)、α,β-亚甲基-ATP、β,γ-亚甲基-ATP、二腺苷五磷酸盐(Ap5A)、1,N^6-亚乙烯基腺苷三磷酸盐、腺苷 1-氧化物三磷酸盐、2',3'-O-(苯甲酰基-4-苯甲酰基)-ATP (B-ZATP)、US2004204420 中所述的 ATP 类似物家族(通过引用将该文献的内容并入本文)、2',3'-O-(2,4,6-三硝基苯基)-ATP (TNP-ATP)、1-N^6(甲氧基)ATP、7-N^6-(吡咯烷基)ATP、2-N^6(乙氧基)ATP、8-N^6(环戊基)ATP、3-N^6(乙酰基)ATP、9-N^6(环戊氧基)ATP、4-N^6(i-丙氧基)ATP、10-N^6-(哌啶基)ATP、5-N^6-(苄基)ATP、11-N^6-(环己基)ATP 等替换。
XIII	胆碱转运蛋白抑制剂, 例如 N-n-烷基烟酸盐(nicotinium)类似物、密胆碱 HC-3、癸烷双胺、氯琥珀胆碱、D-筒箭毒碱、四甲基铵、

[0076]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂

	四乙基铵、己烷双胺、N-烷基类似物(N-乙基胆碱、N-甲基胆碱)、单乙基胆碱、二乙基胆碱和三乙基胆碱、N-羟乙基吡咯烷鎓甲碘化物(吡咯胆碱(pyrrolcholine))、和 Barker, L.A.及 Mittag, T.W. (J Pharmacol Exp Ther. 1975; 192: 86-94)所述的 DL-α-甲基胆碱、二甲基-n-戊基(2-羟乙基)铵离子、癸烷双胺、Cai et al (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, 15: 7042-7047)所述的结构如下的双儿茶酚取代的己烷双胺和癸烷双胺类似物:  1 2
XIV	能够特异性地结合从而抑制胆碱激酶活性的抑制性抗体,特别是,识别 ChoKα 的催化结构域或二聚化结构域并因此抑制 ChoKα 活性的单克隆抗体。在优选实施方案中,所述抑制性抗体是如 WO2007138143 所述的单克隆抗体。在其它优选实施方案,所述抑制性抗体是如 WO2007138143 所述的抗体 AD3、AD8 和 AD11。
XV	如共同未决的国际专利申请 PCT/IB2009/052936 所述的、能够促进胆碱激酶 β (ChoKβ)或其功能等同变体的活性和/或表达的增加的化合物。ChoKβ 促进由 ChoKα 的过表达而造成的肿瘤生长的降低,并因此,ChoKβ 以及促进 ChoKβ 的活性和/或表达的增加的组合物也可以被用作本发明组合物中的 ChoKα 抑制剂。在优选实施方案中,能够增加 ChoKβ 表达的化合物是包含编码 ChoKβ 或其功能变体的核酸序列的多核苷酸。所述多核苷酸是人源的并如 SEQ ID NO:1 所示(GenEMBL AB029886)。在另一优选实施方案中,能够增加 ChoKβ 表达的化合物是如 SEQ ID NO:2 (UniProt 登录号 Q9Y259)所示的 ChoKβ 多肽或其功能等同变体。如本文所用的术语“ChoKβ 变体”被理解为在以下方面表现出与 ChoKβ 基本上相同的性质的多肽:(i) 所述多肽阻止由 ChoKα 活性增加而导致 PCho 的增加的能力;(ii) 所述多肽阻止由 ChoKα 表达增加而导致细胞的癌转化的能力;或(iii)

[0077]

表 1: 适合用于本发明组合物的胆碱激酶抑制剂	
	所述多肽促进磷脂酰乙醇胺甲基转移酶(PEMT)活性增加的能力。鉴定具有本文所述的性质的 ChoK 变体的方法描述于第 P200802007 号共同未决的西班牙专利申请中。 适于用作本发明组合物中 ChoKα抑制剂的 ChoKβ变体优选地与所述 ChoKβ细胞因子具有至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%的序列同一性。使用本领域技术人员熟知的计算机算法和方法测定所述变体和 ChoKβ之间的同一性程度。优选地使用 BLASTP 算法[BLASTManual, Altschul, S., <i>et al.</i>, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., <i>et al.</i>, J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990)]测定两个氨基酸序列之间的同一性。
XVI	磷脂酰乙醇胺 N-甲基转移酶(PEMT 或 EC 2.1.1.17)的抑制剂。用 ChoKα抑制剂处理细胞导致 PEMT 表达的增加(共同未决的西班牙专利申请第 P200802007 号)。此外, 细胞内 ChoKβ的过表达也导致 PEMT 表达的增加(共同未决的西班牙专利申请第 P200802007 号), 这提示 PEMT 的活化可能是 ChoKβ补偿响应于 ChoKα抑制的磷脂酰胆碱水平降低所使用的途径。用于本发明组合物的合适的 PEMT 抑制剂包括 3-脱氮腺苷(deazaadenosine) (DZA) (Vance <i>et al.</i>, 1986, Biochem.Biophys.Acta, 875:501-509)、3-脱氮苄霉素(deazaaristeromycin) (Smith and Ledoux, Biochim Biophys Acta. 1990, 1047:290-3)、苯扎贝特和氯贝酸(Nishimaki-Mogami T <i>et al.</i>, Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1304:11-20)。
XVII	对于胆碱激酶序列特异性的反义寡核苷酸
XVIII	对于胆碱激酶序列特异性的核酶或 DNA 酶
XIX	对于胆碱激酶序列特异性的干扰 RNA, 例如如 SEQ ID NO:3 所示的小发夹 RNA(shRNA)或 Glunde <i>et al.</i> (Cancer Res., 2005, 65:11034-11043)所述的 siRNA。

[0078] 酸性神经酰胺酶抑制剂

[0079] 如本文所用的酸性神经酰胺酶抑制剂涉及能够导致酸性神经酰胺酶活性降低的

任何化合物,包括阻止酸性神经酰胺酶基因表达而导致酸性神经酰胺酶 mRNA 或蛋白水平降低的那些化合物以及与酸性神经酰胺酶的活性位点结合而导致该酶活性降低的化合物。

[0080] 如本文所用的表述“酸性神经酰胺酶抑制剂”涉及能够导致酸性神经酰胺酶活性降低的任何化合物,包括阻止酸性神经酰胺酶基因表达而导致酸性神经酰胺酶 mRNA 或蛋白水平降低的那些化合物以及与酸性神经酰胺酶的活性位点结合而导致该酶活性降低的化合物。

[0081] 可以使用测定 mRNA 表达水平的标准检测来鉴定导致酸性神经酰胺酶 mRNA 水平降低的化合物,所述标准检测例如 RT-PCR、RNA 保护分析、Northern 印迹、原位杂交、微阵列技术等。

[0082] 可以使用测定蛋白表达水平的标准检测来鉴定导致酸性神经酰胺酶蛋白水平降低的化合物,所述标准检测例如 Western 印迹或 Western 转移、ELISA(酶联免疫吸附测定)、RIA(放射性免疫测定)、竞争性 EIA(竞争性酶免疫检测)、DAS-ELISA(双抗体夹心 ELISA)、免疫细胞化学和免疫组织化学技术、基于使用包含特异性抗体的蛋白生物芯片或微阵列的技术、或基于胶体沉淀的、以诸如试纸的形式的检测。

[0083] 可以通过测定使用纯化的酸性神经酰胺酶或富含酸性神经酰胺酶的组分和酸性神经酰胺酶的底物的酸性神经酰胺酶活性的标准检测来鉴定导致酸性神经酰胺酶的酶活性降低的酸性神经酰胺酶抑制剂。例如,ES2233204 中所述的基于对 N-(12-(4-硝基苯-2-氧杂-1,3-二唑)十二烷基)鞘氨醇(Cer-C12-NBD)的水解的抑制的方法。

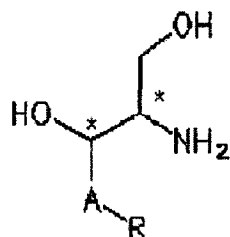
[0084] 可以在本发明第一组合物中使用的示例性的非限制性酸性神经酰胺酶抑制剂或酸性神经酰胺酶样蛋白抑制剂如表 II 的 I 至 XIII 项所示。

[0085]

适合用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂	
I	EP1287815 中所述的鞘氨基醇碱,所述化合物具有以下通用结构式

[0086]

适用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂



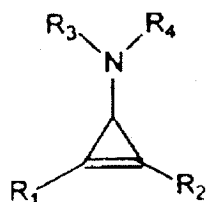
其中

A 是 $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-(R)}$ 、 CH=CH-(R) 或 $\text{C(H)OH-CH}_2\text{-(R)}$ 或 -CH=CH-CHOH-(R) ; 并且

R 是具有 10-22 个碳原子的直链或支链烷基, 其可以任选地含有一个或多个双键和/或可以任选地被一个或多个羟基取代。R 优选为具有 12-18 个碳原子的直链烷基, 更优选为具有 13 个碳原子的直链烷基。两个不对称碳原子可以为 D 或 L 构型。

II

ES2143403 中所述的环烯丙基胺变体, 所述变体具有以下通用结构式

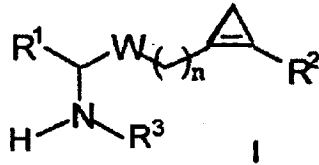


其中

R_1 和 R_2 可以相同或不同, 并对应于 1-18 个碳原子的直链或支链烷基或苯烷基, 所述基团在其末端具有 0 至数个不饱和键和取代基(X), 其中 X 是 -OH 、 -OR , 其中 R 是直链或支链 $\text{C}_1\text{-C}_5$ 烷基或甲基烷基(metiloxialkyl)、 $\text{-CO}_2\text{H}$ 、 $\text{-CO}_2\text{R}$ (其中 R 为上述定义的基团)、 -CON(R)_2 (其中 R 为上述定义的基团和卤素(F、Cl、Br、I)); 并且

R_3 和 R_4 是烷基、烯基、芳基, 它们是相同的或不同的或可以构成芳香环或邻苯二甲酰胺型环的一部分。

[0087]

适合用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂	
	在优选实施方案中,符合上述通式的适合用于本发明的化合物为N-(1-戊基-2-丁基-3-环丙基-苯基)邻苯二甲酰胺
III	ES2233204 中所述的环丙基鞘氨醇衍生物,所述衍生物具有以下通用结构式  I 其中 n 是可以代表任何值的整数 W 是 -CH₂-、-CH(OH)-、-C(=O)-、-C(=NOH)-、-C(=N-H₂)-、-C(=S)-、-CH(SH)- R¹ 选自: (a) H (b) -CH₃、-CH₂OH、-CH₂SH、-CH₂NH₂、-CH₂N₃、-CH₂NH-OH、-CH=N-OH、-CH=N-NH₂、-C(=O)H、-C(=O)CH₃、-C(=O)CF₃、-C(=O)NH₂、-SCH₃、-OCH₃、-CH₂O-P(=O)(OH)₂ 或 -CH₂CH₂-P(=O)残基, 和 (c) -(CH₂)_nR₄、-C(OH)R₄、-C(=O)R₄、-C(SH)R₄、-C(=S)R₄、-C(=N)R₄ 或 -C(NH)R₄, 其中 n 为 0 或 1, R₄ 是直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基, 所述芳基含有或不含有杂原子并且在任何位置含有取代基或在一个或多个位置被取代的杂环 R² 选自: (a) H (b) 直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基, 所述芳基含有或

[0088]

适用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂

不含有杂原子并且在任何位置含有取代基或在一个或多个位置被取代的杂环

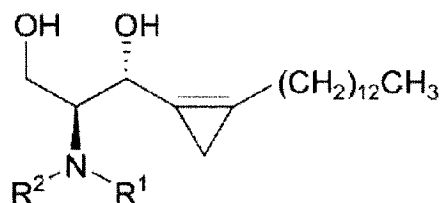
R^3 选自:

(a) H

(b) 直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基, 所述芳基含有或不含有杂原子并且在任何位置含有取代基或在一个或多个位置被取代的杂环

(c) $-(C=X)-Y-R_5$ 或 $-(C=X)-R_5$, 其中 X 是 O、S、N, Y 是 O、S、-NH 或 -CHOH, 并且 R_5 是 H 或直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基, 所述芳基含有或不含有杂原子并且在任何位置含有取代基或在一个或多个位置被取代的杂环。

优选的具有上述通用结构的化合物是 Bedia et al. (ChemBioChem., 2007, 8:642-648)所述的化合物 GT54、GT45、GT76、GT77、GT85、GT99 和 GT98, 所述化合物为



GT54: $R^1=CH_3$; $R^2=CO(CH_2)_6CH_3$

GT45: $R^1=H$; $R^2=COO(CH_2)_7CH_3$

GT76: $R^1=H$; $R^2=CONH(CH_2)_7CH_3$

GT77: $R^1=H$; $R^2=CSNH(CH_2)_7CH_3$

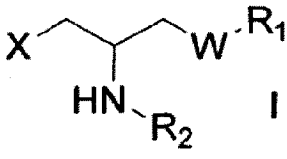
GT85: $R^1=H$; $R^2=COCOCH_2CH_3$

GT99: $R^1=H$; $R^2=COCO(CH_2)_5CH_3$

GT98: $R^1=H$; $R^2=COCOC_6H_5$

以及 Bedia et al (Org. Biomol.Chem., 2005, 3:3707-3712)所述的化合物 GT11、GT1、GT2、GT3、GT4、GT5、GT6 和 GT7, 所

[0089]

适用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂	
	述化合物具有以下结构: GT11: $R^1=H, R^2=CO(CH_2)_6CH_3$ 1: $R^1=CH_3, R^2=CO(CH_2)_6CH_3$ 2: $R^1=H, R^2=COO(CH_2)_7CH_3$ 3: $R^1=H, R^2=CONH(CH_2)_7CH_3$ 4: $R^1=H, R^2=CSNH(CH_2)_7CH_3$ 5: $R^1=H, R^2=COCOCH_2CH_3$ 6: $R^1=H, R^2=COCO(CH_2)_5CH_3$ 7: $R^1=H, R^2=COCOC_6H_5$
IV	ES2273560 所述的化合物, 所述化合物具有以下通式  I 其中 W 是 $-O-$、$-S-$、$-S(=O)-$、$-S(=O)_2-$ X 选自 (a) OH (b) $-OP(=O)-(OR^3)_2$, 其中 R^3 可以是相同的或不同的, 并且为 H、CH_3 或 CH_2CH_3。 (c) $-CH_2P(=O)-(OR^3)_2$, 其中 R^3 可以是相同的或不同的, 并且为 H、CH_3 或 CH_2CH_3。 R^1 是直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基, 所述芳基含有或不含有杂原子并且在任何位置含有取代基或在一个或多个位置被取代的杂环 R^2 选自 (a) H (b) 直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基, 所述芳基含有或不含有杂原子并且在任何位置含有取代基或在一个或多个位置

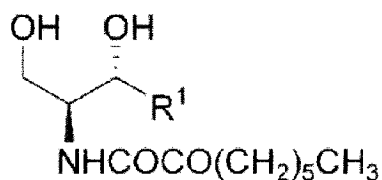
[0090]

适用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂

被取代的杂环；和

(c) $-(C=X)-Y-R_5$ 或 $-(C=X)_n-R_5$ ，其中 n 为 0 或 1， X 为 O、S、N， Y 为 O、S、 $-NH$ 或 $-CHOH$ 或 $-CHZ$ ，其中 Z 是卤素并且 R_5 为 H 或直链或支链烷基、烯基、炔基、芳基，所述芳基含有或不含有杂原子并且在任何位置含有取代基或在一个或多个位置被取代的杂环。

优选的具有上述通用结构的化合物是 Bedia et al. (ChemBioChem., 2007, 8:642-648) 所述的化合物 GT102、GT103 和 GT104，所述化合物为：



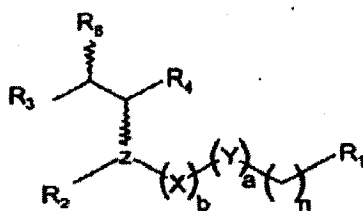
GT102: $R^1 = \text{---}\equiv\text{---}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

GT103: $R^1 = \text{---}\text{CH=CH---}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$

GT104: $R^1 = \text{---}(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$

V

WO2007136635 中所述的化合物，所述化合物具有以下通用结构式



其中

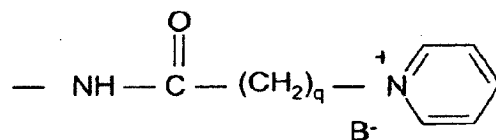
R_1 为 H、OH、SH、 NH_2 、Cl、Br、I、COOH、 $CONH_2$ 、 $NH(C=NH)NH_2$ 、 NHR_2 、 $N(R_2)_2$ 、 $^+N(R_2)_3$ ，或在环中具有 5-6 个

适用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂

原子的 N-杂环;

R_2 为 H 或 C_1-C_6 烷基;

R_3 是任选地被一个或多个 R_5 取代的苯基; 五元单环杂环; 六元单环杂环; 五元和五元双环杂环; 六元和六元双环杂环; 五元和六元双环杂环; 五元、五元和五元三环杂环; 六元、六元和六元三环杂环; 五元, 五元和六元三环杂环; 五元、六元和六元三环杂环; 六元、五元和六元三环杂环; 五元, 六元和五元三环杂环; 上述每一项任选地被一个或多个 R_5 取代, 其中 R_5 为 C_1-C_6 烷基、F、Cl、Br、I、 NHR_2 、 NO_2 或具有下式的酰胺



其中 R_2 如上所述

R_4 是 H、 C_1-C_6 烷基、 CH_2OH 、SH、 NH_2 、 CH_2Cl 、 CH_2Br 、 CH_2I 、 $COOH$ 、 $CONH_2$;

R_6 是 H 或 OH;

X 是 CH_2 、 CHC_1-C_6 烷基、CO 或 CS;

Y 是 CH_2 、CO、NH、O 或 $C(OH)$;

Z 是 N 或 ^+NH ;

A 是 0 或 1;

B 是 0 或 1;

n 是 2-22 的整数;

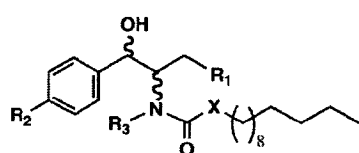
q 是 2-18 的整数; 并且

B 是药学上可接受的平衡阴离子

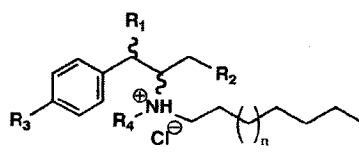
[0092]

适用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂

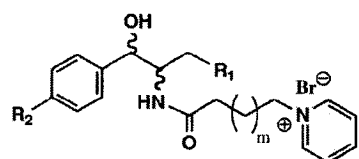
优选的符合上述通式的化合物包括 Bielawska et al (Bioorg. Med. Chem., 2008, 16:1032-1034)和 Szulc et al (Bioorg. Med. Chem., 2008, 16:1015-1031)所述的 B13 和(1S,2R)-N-肉豆蔻酰氨基-苯丙醇-1 (D-e-MAPP)变体, 所述化合物具有以下结构



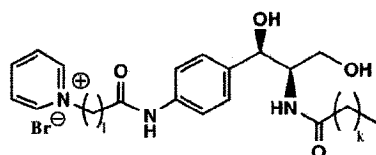
- A** {
- LCL11-(1S, 2R): X = CH₂, R_{1,2} = H, R₃ = CH₃
 - LCL12-(1R, 2S): X = CH₂, R_{1,2} = H, R₃ = CH₃
 - LCL13-(1S, 2S): X = CH₂, R_{1,2} = H, R₃ = CH₃
 - LCL14-(1R, 2R): X = CH₂, R_{1,2} = H, R₃ = CH₃
- B** {
- LCL15-(1R, 2R): X = NH, R₁ = OH, R₂ = NO₂, R₃ = H
 - LCL16-(1S, 2R): X = NH, R_{1,2,3} = H
 - LCL17-(1R, 2S): X = NH, R_{1,2,3} = H
 - LCL81-(1S, 2S): X = NH, R₁ = OH, R₂ = NO₂, R₃ = H



- C** {
- LCL18-(1S, 2S): R_{1,2} = OH, R_{3,4} = H, n = 8
 - LCL204-(1R, 2R): R_{1,2} = OH, R₃ = NO₂, R₄ = H, n = 8
 - LCL284-(1S, 2R): R₁ = OH, R_{2,3,4} = H, n = 8
 - LCL286-(1S): R_{1,3,4} = H, R₂ = OH, n = 8
 - LCL289-(1R, 2S): R₁ = OH, R_{2,3,4} = H, n = 8
 - LCL343-(1S, 2S): R_{1,2} = OH, R₃ = NO₂, R₄ = H, n = 8
 - LCL346-(1R, 2R): R₁ = OH, R_{2,3,4} = H, n = 8
 - LCL347-(2R): R_{1,3,4} = H, R₂ = OH, n = 8
 - LCL378-(1S, 2R): R₁ = OH, R_{2,3,4} = H, n = 6
 - LCL381-(1S, 2R): R₁ = OH, R_{2,3} = H₂, R₄ = CH₃, n = 8
 - LCL385-(1R, 2R): R_{1,2} = OH, R_{3,4} = H, n = 8
 - LCL397-(1S, 2R): R_{1,3,4} = H, R₂ = OH, n = 10

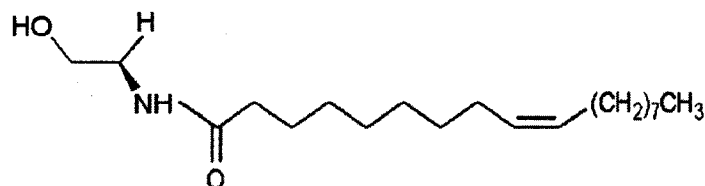


- D** {
- LCL82-(1R, 2R): l = 5, k = 12
 - LCL85-(1R, 2R): R₁ = H, R₂ = NO₂, m = 13
 - LCL120-(1S, 2R): R_{1,2} = H, m = 13
 - LCL420-(1R, 2S): R_{1,2} = H, m = 13



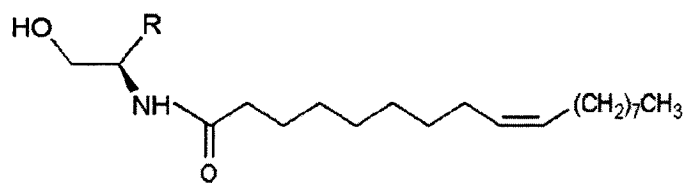
VI

Sugita et al (Biochim.Biophys.Acta, 1975, 398:125-131)所述的 N-油酰乙醇胺(NOE), 其具有以下结构

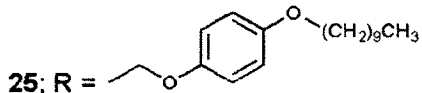
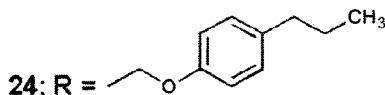
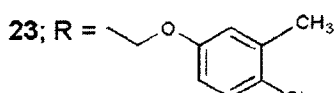
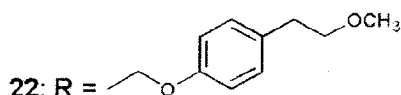
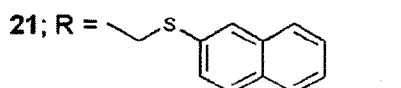
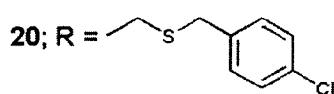
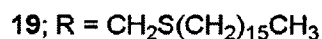
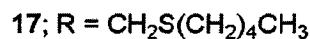
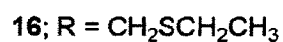
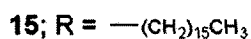
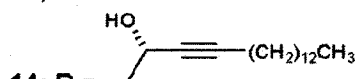
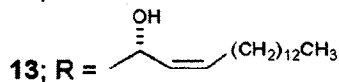
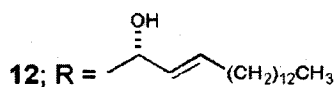
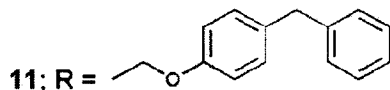
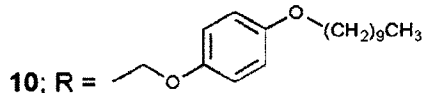
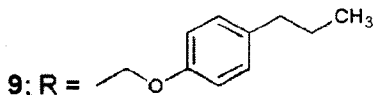
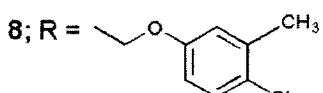
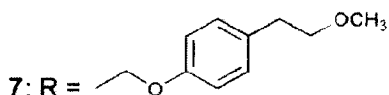
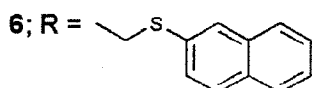
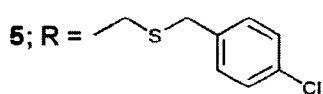
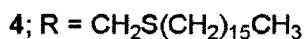
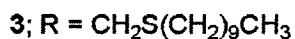
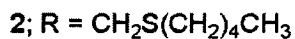
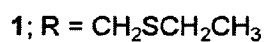


和如 Grijalvo et al., (Chem.Phys.Lipids, 2006, 144:69-84)所述的它的变体, 所述变体具有以下通用结构

适用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂



其中 R 选自

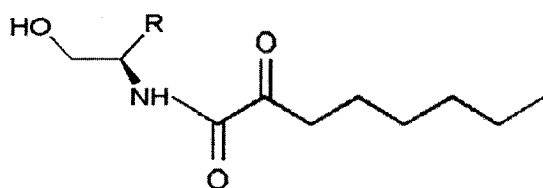


VII

如 Grijalvo et al., (Chem.Phys.Lipids, 2006, 144:69-84)所述的 2-氧代辛酰胺, 其具有以下通用结构

[0094]

适合用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂



其中 R 选自

1; R = CH₂SCH₂CH₃

2; R = CH₂S(CH₂)₄CH₃

3; R = CH₂S(CH₂)₉CH₃

4; R = CH₂S(CH₂)₁₅CH₃

5; R =

6; R =

7; R =

8; R =

9; R =

10; R =

11; R =

12; R =

13; R =

14; R =

15; R = (CH₂)₁₅CH₃

16; R = CH₂SCH₂CH₃

17; R = CH₂S(CH₂)₄CH₃

18; R = CH₂S(CH₂)₉CH₃

19; R = CH₂S(CH₂)₁₅CH₃

20; R =

21; R =

22; R =

23; R =

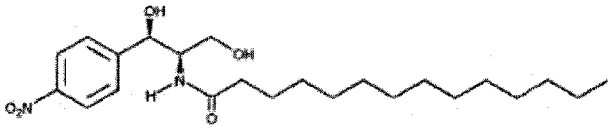
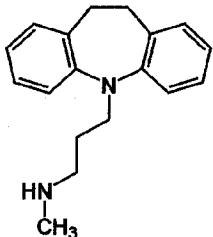
24; R =

25; R =

VIII

如 Selzner et al (Cancer Res., 2001, 61:1233-1240)所述的 (1R,2R)-N-肉豆蔻酰氨基-4'-硝基-苯丙二醇-1,3 (B13) (D-NMAPPD), 其具有以下结构

[0095]

适合用于本发明组合物的酸性神经酰胺酶抑制剂	
	 及其类似物
IX	具有以下结构的地昔帕明 
X	能够特异性地结合并抑制酸性神经酰胺酶或酸性神经酰胺酶样蛋白的活性的抑制性抗体
XI	对于酸性神经酰胺酶或酸性神经酰胺酶样蛋白的序列特异性的反义寡核苷酸
XII	对于酸性神经酰胺酶或酸性神经酰胺酶样蛋白的序列特异性的核酶或 DNA 酶
XIII	对于酸性神经酰胺酶或酸性神经酰胺酶样蛋白的序列特异性的干扰 RNA，例如 Morales et al (Oncogene, 2007, 26:905-916) 中所述的、用于使肝癌细胞对柔红霉素的处理敏感的干扰 RNA (SEQ ID NO:5)，或 WO2007136635 中所述的、用于使头颈癌细胞系对于 FasL 基因治疗敏感的干扰 RNA (SEQ ID NO:6)

[0096] 酸性神经酰胺酶特异性抑制性抗体或胆碱激酶特异性抑制性抗体

[0097] 针对位于酸性神经酰胺酶或胆碱激酶中的表位的抗体可以有效地阻断这些蛋白的功能，并且因此可被用作本发明组合物中的抑制剂。如本文所用的“抑制性抗体”是指能够至少部分地抑制酸性神经酰胺酶或胆碱激酶的生物活性的抗体。

[0098] 通过使用纯化的酸性神经酰胺酶或富含酸性神经酰胺酶的组分的标准检测来测量酸性神经酰胺酶活性从而检测对于酸性神经酰胺酶生物活性的抑制能力的测定，例如 ES2233204 中所述的基于抗体抑制 N-(12-(4-硝基苯-2-氧杂-1,3-二唑)十二烷基)鞘氨醇 (Cer-C12-NBD) 水解的方法。

[0099] 使用标准检测来测量胆碱激酶的活性从而检测对于胆碱激酶生物活性的抑制能

力的测定,例如如 EP1710236 中所述的方法,该方法基于在纯化的重组胆碱激酶或富含胆碱激酶的组分存在下、ATP 对 [^{14}C] 标记的胆碱的磷酸化作用的检测,然后使用标准分析技术(例如 TLC)检测磷酸化的胆碱。

[0100] 对于胆碱激酶或酸性神经酰胺酶特异性的抑制性抗体或片段可容易获得或可以使用常规分子生物学技术容易地制备。例如,利用来源于例如酸性神经酰胺酶或胆碱激酶的免疫原,就可能通过使用标准方法获得抗蛋白/抗肽抗血清或单克隆抗体(参见,例如, *Antibodies :A Laboratory Manual* (抗体:实验手册) ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press:1988))。可以用免疫原形式的肽(例如,酸性神经酰胺酶或胆碱激酶或它们的能够引发抗体应答的抗原性片段)免疫诸如小鼠、仓鼠或兔的哺乳动物。赋予蛋白或肽免疫原性的技术是本领域公知的,包括与载体或其它技术共轭。可以在佐剂的存在下给予多肽的免疫原部分。可以通过检测血浆或血清中的抗体滴度来监测免疫的进程。可以将免疫原作为抗原,使用标准 ELISA 或其它免疫测定来评价抗体水平。在优选实施方案中,构成本发明组合物的一部分的抗体对于酸性神经酰胺酶或胆碱激酶(或与其同一性为至少 80%、85%、90%、95%、或 98% 的变体)的抗原决定簇是免疫特异性的。在某些实施方案中,免疫特异性主题抗体基本上不与非脊椎动物(例如酵母)酸性神经酰胺酶或胆碱激酶相关蛋白发生交叉反应。“基本上不发生交叉反应”表示所述抗体所具有的对于非同源蛋白的结合亲和力比所述抗体对于酸性神经酰胺酶或胆碱激酶的结合亲和力低至少一个数量级、更优选地至少 2 个数量级以及甚至更优选地至少 3 个数量级。

[0101] 因此,本发明的抗体能够结合胆碱激酶或酸性神经酰胺酶的表位;通常,需要至少 6、8、10 或 12 个连续氨基酸来形成表位,然而,包含非连续氨基酸的表位可能需要更多氨基酸,例如至少 15、25 或 50 个氨基酸。术语“本发明的抗体”包括,例如多克隆抗体、单克隆抗体、抗体的 Fab 和单链 Fv(scFv) 片段、双特异性抗体、异源共轭物、人源抗体和人源化抗体。可以以多种方式制备这些抗体,包括杂交瘤培养物、细菌或哺乳动物细胞培养物中的重组表达和转基因动物中的重组表达。也可以通过从展示系统中表达的序列的文库中选择序列来制备抗体,所述展示系统例如丝状噬菌体、细菌、酵母或核蛋白体。对于选择特定的制备方法,文献中有很多指导,例如, Chadd and Chamow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12: 188-194 (2001)。制备方法的选择取决于几个因素,包括所需的抗体结构、抗体上碳水化合物部分的重要性、培养和纯化的方便性、和费用。使用标准表达技术可以产生很多不同抗体结构,包括全长抗体、诸如 Fab 和 Fv 片段的抗体片段、以及包含来自不同物种的组分的嵌合抗体。可以在细菌表达系统中产生诸如 Fab 和 Fv 片段的、没有效应功能和具有有限的药代动力学活性的小型抗体片段。单链 Fv 片段表现出低免疫原性并且从血液中被快速清除。

[0102] 本发明的抗体可以是多克隆抗体。例如,在免疫剂并优选伴有佐剂的一次或多次注射后可以在哺乳动物、例如非人哺乳动物中制备这种多克隆抗体。通常,通过一系列皮下或腹膜内注射将免疫剂和/或佐剂注射入哺乳动物中。所述免疫剂可以包括胆碱激酶或酸性神经酰胺酶、或它们的片段或融合蛋白、或表达胆碱激酶或酸性神经酰胺酶的细胞。在合适佐剂的存在下将这些蛋白、片段或制剂引入非人哺乳动物中。给予免疫原的其它形式是作为细胞表面的跨膜蛋白(例如 Spiller et al. *J. Immunol. Methods*, 224:51-60 (1999) 中所述的方法)。这些细胞可以是天然表达所述抗原的细胞,或在用 DNA 构建体转染细胞后可以获得所述抗原表达,所述 DNA 构建体含有编码所述抗原的 DNA 序列、所述抗原在细胞中充

分表达所必需的 DNA 序列以及其它 DNA 序列。该方法不仅在细胞膜是抗原表达的天然位点时是可能的,而且抗原一旦在细胞中合成就被添加在抗原编码序列的信号肽引导至这些位置。如果血清含有对于不希望的表位的多克隆抗体,则可以通过免疫亲和色谱纯化该多克隆抗体。

[0103] 可选地,所述抗体可以是单克隆抗体。可以利用杂交瘤制备单克隆抗体,其中用免疫剂对小鼠、仓鼠或其它合适宿主动物进行免疫以激发产生或能够产生特异性地与所述免疫剂结合的抗体的淋巴细胞,例如 Kohler and Milstein, Nature 256:495(1975)。所述免疫剂通常包括胆碱激酶、酸性神经酰胺酶、或它们的受体或片段或融合蛋白以及任选地包括载体或富集了胆碱激酶或酸性神经酰胺酶的粗蛋白制剂、或表达任意所述蛋白的细胞。在合适的佐剂的存在下将这些蛋白、片段或制剂引入非人哺乳动物中。给予免疫原的其它形式是作为细胞表面的跨膜蛋白(例如 Spiller et al. J. Immunol. Methods, 224:51-60(1999)中所述的方法)。这些细胞可以是在其细胞膜天然表达所述抗原的每个细胞,或在用 DNA 构建体转染细胞后可以获得所述抗原表达,所述 DNA 构建体含有编码所述抗原的 DNA 序列、所述抗原在细胞中充分表达所必需的 DNA 序列以及其它 DNA 序列。该方法不仅在细胞膜是抗原表达的天然位点时是可能的,而且抗原一旦在细胞中合成就被添加在抗原编码序列的信号肽引导至这些位置。可选地,可以体外免疫淋巴细胞。通常,如果需要非人哺乳动物来源,则使用脾细胞或淋巴结细胞,或如果需要人源细胞,则使用外周血淋巴细胞(“PBL”)。使用诸如聚乙二醇的合适的融合剂将淋巴细胞与永生化细胞系融合,从而制备杂交瘤细胞。通常,永生化细胞系是大鼠、小鼠、牛或人来源的骨髓瘤细胞。在合适的培养基中培养杂交瘤细胞,所述培养基优选地含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞的生长或存活物质。使用有限稀释法分离克隆,并且可以通过常规技术检测培养杂交瘤细胞的培养基(上清)中针对 ChoK 的单克隆抗体的存在,例如通过流式细胞仪或免疫沉淀或诸如 RIA 或 ELISA 的其它体外结合测定。还可以以动物内的腹水肿瘤在体内培养克隆。

[0104] 优选地,通过免疫沉淀或诸如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)的体外结合测定或诸如荧光显微镜或流式细胞仪的免疫荧光技术来测定由杂交瘤细胞的克隆所产生的单克隆抗体的结合特异性。通过常规免疫球蛋白纯化步骤从培养基、腹水液或血清中适当地分离由亚克隆分泌的单克隆抗体,例如,蛋白 A-琼脂糖凝胶、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳,透析或亲和色谱。

[0105] 还可以通过重组 DNA 方法制备单克隆抗体,例如 US 4,816,567 中所述的方法。可以从胆碱激酶或酸性神经酰胺酶受体特异性杂交瘤细胞中分离编码本发明的单克隆抗体的 DNA,并通过使用常规步骤进行测序,例如通过使用能够与编码鼠源抗体的重链和轻链的基因特异性地结合的寡核苷酸探针。杂交瘤细胞作为该 DNA 的优选来源。一旦被分离,可以将所述 DNA 插入表达载体,然后将所述表达载体转染入宿主细胞,从而实现重组宿主细胞中单克隆抗体的合成,所述宿主细胞例如猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不会以其他方式产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞。还可以修饰所述 DNA,例如,通过使鼠源重链和轻链恒定结构域的编码序列被取代为同源人源序列,或通过使非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或一部分共价连接至免疫球蛋白编码序列。所述非免疫球蛋白多肽可以被取代为本发明的抗体的恒定结构域,或可以被取代为本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域,从而产生嵌合二价抗体。

[0106] 产生对于靶分子具有反应性的特异性抗体或抗体片段的另一方法是筛选细菌、酵母、丝状噬菌体、核糖体或核糖体亚基和其它展示系统中表达的编码免疫球蛋白基因或其部分的表达文库。这些方法通常使用来自不同来源的抗体序列或抗体片段序列的大型文库,所述来源例如健康供体或患者或健康或非健康的动物。将这些序列克隆并表达在合适的系统中,并且通过其对于抗原的结合亲和力进行选择。已有选择具有诸如中和、激动剂等所需性质的抗体或片段的不同方法的描述,(Fernández, Curr. Op. Biotech., 15: 364-373(2004); Schmidt, Eur. J. Biochem., 268:1730-1738(2001))。在一个实施方案中,还可以利用重组手段、通过提取信使 RNA、构建 cDNA 文库和选择编码抗体分子节段的克隆来制备具有本发明杂交瘤的特征的抗体和抗体片段。

[0107] 还可以对抗体进行基因工程以改变其临床用途。很多方法利用分子生物学和遗传技术,例如利用对遗传学和免疫球蛋白结构的深入了解来构建免疫球蛋白分子的不同修饰,目的在于改进其用于临床用途或其他用途的性质。某些方法倾向于降低所述分子在其被使用的物种中的免疫原性,并且所得分子具有与该物种同源性更高的序列。各种方法已被用于获得人源 mAb,这避免了健康人中伦理学不允许的行为。在其他方法中,减小了分子量和分子大小,例如为了改善所述分子在实体瘤中的分布。其他可能性是在分子中共轭对于多于一个靶分子的结合结构域(双特异性抗体或三特异性抗体等)或将抗体或片段与具有所需功能的另一分子共轭,所述另一分子例如毒性剂、激素、生长因子、免疫调节剂(免疫抑制剂或免疫刺激剂)、细胞生长抑制剂等。一般而言,所有得到的分子几乎保留抗体的一个可变结构域,所述可变结构域给予具有抗原-抗体结合特征的高特异性和亲和力。这些构建中的一些实例为:

[0108] - 嵌合抗体:

[0109] 嵌合抗体是指用来自某些物种(通常为产生 mAb 的哺乳动物)的抗体的可变区和其它物种(所述嵌合抗体将被使用的物种)的恒定区所构建的抗体。此类构建的目的在于获得这样的抗体:具有最初的 mAb、但具有较小的免疫原性并且被待治疗的个体更好地耐受、具有改善的血清半衰期并且可以被效应免疫学机制识别,即补体、细胞毒性细胞的 Fc 受体或其它表现出物种特异性的免疫球蛋白特异性受体。

[0110] - 人源化抗体:

[0111] “人源化抗体”表示这样的抗体:其来源于非人源抗体,通常为鼠源抗体,并保留母体抗体的抗原结合性质,但是在人中免疫原性较低。可以通过各种方法实现这点,包括(a)将完整非人源可变结构域嫁接到人源恒定区上以产生嵌合抗体;(b)仅将非人源互补决定区(CDR)嫁接到人框架区和恒定区上,保留或不保留关键框架残基;和(c)移植完整非人源可变结构域,但是通过替换表面残基用人源样节段“遮掩”它们。将非人源抗体人源化的方法在本领域中已有描述。优选地,人源化抗体具有引入其中的一个或多个非人源氨基酸残基。这些非人源氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其通常取自“输入”可变结构域。可以本质上遵照 Winter 及其同事的方法(Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536(1988))进行人源化,通过将高变区序列取代为人源抗体的对应序列。在实践中,人源化抗体通常是人源抗体,其中某些高变区残基以及可能有某些框架区(FR)残基被来自啮齿动物抗体中相似位点的残基所取代。对于制备人源化抗体中使用的人源可变结构域的选择,包括重链

和轻链,非常重要是降低免疫原性,而保留对于抗原的特异性和亲和力。根据所谓的“最佳配合”法,将啮齿动物抗体的可变结构域的序列针对已知人源可变结构域序列的完整文库进行筛选。然后,最接近啮齿动物序列的人源序列被接受为所述人源化抗体的人源框架区 (FR) (Suns et al., J. Immunol., 151:2296(1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901(1987))。另一方法使用来源于特定亚群轻链或重链的全部人源抗体的一致序列的特定框架区。同一框架可以用于数种不同人源化抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623(1993))。

[0112] 更重要的是,人源化的抗体保留对于抗原的高亲和力和其他所需生物学性质。为实现该目标,根据优选方法,使用母体和人源化序列的三维模型,通过母体序列和各种理论上的人源化产物的分析过程来制备人源化抗体。

[0113] - 灵长动物源化抗体:

[0114] 制备与人源抗体的更相似的抗体的过程中的下一步是所谓的灵长动物源化抗体,即被进行基因工程从而含有猴类(或其它灵长类)抗体、特别是食蟹猴(cynomolgus monkey)抗体的可变重链和轻链结构域,并且含有人源恒定结构域序列、优选为人源免疫球蛋白 $\gamma 1$ 或 $\gamma 4$ 恒定结构域(或 PE 变体)的重组抗体。此类抗体的制备描述于 Newman et al., Biotechnology, 10:1455-1460(1992)、US 5658570 和 US 6113898 中。据报道,这些抗体表现出与人源抗体的高度同源性、即 85-98% 的同源性,展现人源效应功能,具有降低的免疫原性,并且可以表现出对于人抗原的高亲和力。Newman, Biotechnology, 10:1455-1460(1992) 公开了产生重组抗体的另一高效方法。

[0115] - 人源抗体:

[0116] “人源抗体”表示通过任何已知标准方法制备的、完整含有人源轻链和重链以及恒定区的抗体。

[0117] 作为人源化的备选方案,可以产生人源抗体。例如,现已可以获得在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下通过免疫能够产生人源抗体的完整组分的转基因动物(例如,小鼠)。例如,已有报道,嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区 PH 基因的纯合缺失导致了内源性抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这种种系突变小鼠中会导致免疫后人源抗体的产生。参见,例如, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258(1993)。

[0118] 可选地,噬菌体展示技术 (McCafferty et al., Nature 348:552-553(1990)) 可以用于从来自供体的免疫球蛋白可变 (V) 结构域基因全部组分体外产生人源抗体和抗体片段。根据该技术,将抗体 V 结构域基因框内克隆至诸如 M13 或 fd 的丝状噬菌体的主要或次要包被蛋白基因,并展示为噬菌体颗粒表面上的功能抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,基于抗体的功能性质的选择还导致编码表现那些性质的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟 B 细胞的某些性质。可以以各种形式进行噬菌体展示;关于它们的综述,可参见,例如, Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。

[0119] 还可以通过体外活化的 B 细胞或 SCID 小鼠产生人源抗体,所述 SCID 小鼠的免疫系统用人源细胞进行了重建。

[0120] 一旦获得人源抗体,可以分离它的编码 DNA 序列,将其克隆并引入合适的表达系

统,即优选地来自哺乳动物的细胞系,所述细胞系随后表达并释放至可以从中分离抗体的培养基中。

[0121] - 抗体片段:

[0122] 抗体片段是抗体的片段,例如,Fab、F(ab')₂、Fab' 和 scFv。已经开发了各种产生抗体片段的技术。通常,通过完整抗体的蛋白水解消化获得这些片段,但是最近可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。在其它实施方案中,所选的抗体是单链 Fv(scFv) 片段,另外,所述单链 Fv(scFv) 片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0123] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生 2 个相同的称为“Fab”片段的抗原结合片段和一个残余“Fc”片段,每个“Fab”片段具有单一抗原结合位点,从所述“Fc”片段的名称可容易地知道其具有成结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有 2 个抗原结合位点的 F(ab')₂ 片段并仍能交联抗原。

[0124] “Fv”是最小抗体片段,其含有完整抗原识别和抗原结合位点。该区 由一条重链和一条轻链可变结构域紧密非共价相联的二聚体组成。这样的构型使得每个可变结构域的 3 个高变区相互作用,从而形成二聚体表面上的抗原结合位点。6 个高变区共同地赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单一可变结构域(或仅包含 3 个抗原特异性高变区的 Fv 的一半)也具有识别和结合抗原的能力,但是亲和力要低于完整结合位点。

[0125] Fab 片段还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段的不同在于在重链 CH1 结构域的羧基末端增加了数个残基,所述残基包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。在本文中,恒定结构域的半胱氨酸残基携带至少一个自由巯基的 Fab' 被指定为 Fab'-SH。F(ab')₂ 抗体片段在最初产生时为 Fab' 片段对,所述 Fab' 片段在它们间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0126] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。优选地,Fv 多肽还包含 VH 和 VL 结构域之间的多肽连接物,所述多肽连接物使 scFv 能形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述,参见在单克隆抗体药理学中的 Pluckthun(Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies), vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, N. Y., pp. 269-315(1994)。

[0127] 术语“双链抗体”是指具有 2 个抗原结合位点的小的抗体片段,该片段包含在同一多肽链(VH-VL)中相连接的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。通过使用过短而不允许同一链上的 2 个结构域进行配对的连接物,迫使所述结构域与另一链的互补结构域进行配对,并产生 2 个抗原结合位点。双链抗体详细描述于例如 EP 404,097;WO 93/11161;和 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993) 中。

[0128] 本发明中所包括的结合 ChoK 的抗体功能性片段保留至少一种该片段所来自的全长抗体的结合功能和/或调节功能。优选的功能性片段保留对应全长抗体的抗原结合功能(例如,结合哺乳动物 ChoK 的能力)。特别优选的功能性片段保留抑制一种或多种哺乳动物 ChoK 的特征性功能的能力,例如结合活性、信号传导活性和/或细胞应答的刺激。例如,在一个实施方案中,功能性片段能抑制 ChoK 与一种或多种 ChoK 的配体的相互作用和/或能抑制一种或多种受体介导的功能。

[0129] - 双特异性抗体:

[0130] 双特异性抗体是具有对于至少 2 种不同表位的结合特异性的抗体。示例性的双特

异性抗体可以与 2 种不同的 B 细胞表面标志物表位结合。其它此类抗体可以结合第一 B 细胞标志物并且还可以结合第二 B 细胞表面标志物。可选地,抗 B 细胞标志物结合臂可以与结合白细胞上触发分子的臂结合,所述触发分子例如 T 细胞受体分子(例如 CD2 或 CD3),或者抗 B 细胞标志物结合臂可以与 IgG 的 Fc 受体(FcyR)结合,所述 IgG 的 Fc 受体例如 FcyRI(CD64)、FcyRII(CD32)和 FcyRIII(CD 16),这样可以将细胞防御机制集中到 B 细胞。双特异性抗体还可以用于将细胞毒性剂定位到 B 细胞。这些抗体具有 B 细胞标志物结合臂和结合细胞毒性剂(例如皂草素、抗干扰素- α 、长春花生物碱、蓖麻毒素 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。双特异性抗体可以被制备为全长抗体或抗体片段(例如 F(ab)2 双特异性抗体)。

[0131] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的常规制备是基于 2 个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中所述 2 个链具有不同的特异性(Millstein et al., Nature, 305 :537-539 (1983))。因为免疫球蛋白重和轻链发生随机配合,所以这些杂交瘤(细胞杂交瘤)产生 10 种不同抗体分子的可能的混合物,其中仅有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和色谱步骤完成的正确分子的纯化十分繁琐,并且收率低。相似的方法公开于 WO 93/08829 和 Traunecker et al., EMBO J, 10 :3655-3659 (1991) 中。

[0132] 根据不同的方法,将具有所需结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。所述融合优选是与包含至少部分的铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定结构域。优选地,使含有轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)存在于至少一个融合中。将编码免疫球蛋白重链融合的 DNA 并且如果需要的话将编码免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分别的表达载体,并共转染入合适的宿主生物体。当构建中使用的 3 个多肽链的不同比例能提供最佳收率时,这为调整实施方案中 3 个多肽片段的共同比例提供了很好的灵活性。然而,当至少 2 个多肽链相同比例的表达能得到高收率时或当比例不是特别重要时,也可以将 2 个或所有 3 个多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0133] 双特异性抗体包括交联抗体或“异源共轭物”抗体。例如,所述异源共轭物中的一个抗体可以与抗生物素蛋白偶联,另一个抗体可以与生物素偶联。例如,此类抗体已被计划用于使免疫系统细胞靶向于不想要的细胞。可以使用任何方便的交联方法制备异源共轭物抗体。合适的交联剂是本领域公知的,并且公开于 US 4,676,980,其中还公开了很多交联技术。

[0134] 从抗体片段产生双特异性抗体的技术在文献中也已有描述。例如,可以使用化学连接制备双特异性抗体。

[0135] 酸性神经酰胺酶或胆碱激酶特异性 RNA 干扰 (RNAi)

[0136] 在另一实施方案中,构成本发明组合物一部分的酸性神经酰胺酶或胆碱激酶抑制剂是 RNAi, RNAi 能够阻止酸性神经酰胺酶和 / 或胆碱激酶或酸性神经酰胺酶和 / 或胆碱激酶功能所必需的任何组分基因的表达。RNAi 是序列特异性转录后基因抑制的过程,其可以发生在真核细胞中。通常,该过程涉及双链 RNA(dsRNA) 诱导的特定序列 mRNA 的降解,所述双链 RNA 与所述特定序列是同源的。例如,对应于特定单链 mRNA(ss mRNA) 序列的长 dsRNA 的表达会使该信息不稳定,从而“干扰”相应基因的表达。因此,任何选定的基因可以通过引入对应于该基因 mRNA 的全部或重要部分的 dsRNA 而被抑制。发现当长 dsRNA 表达时,其

首先被核糖核酸酶 III 加工为长度为 21-22 个碱基对的较短 dsRNA 寡核苷酸。因此,可以通过引入或表达相对较短的同源 dsRNA 来实现 RNAi。实际上,如下文所述,使用相对较短的同源 dsRNA 可以具有一定优势。

[0137] 用于实现 RNAi 的双链寡核苷酸的长度优选少于 30 个碱基对,并且更优选地,包含约 25、24、23、22、21、20、19、18 或 17 个核糖核酸碱基对。任选地,本发明的 dsRNA 寡核苷酸可以包括 3' 悬突末端。示例性的 2 个核苷酸的 3' 悬突可以由任意类型的核糖核苷酸残基组成,并且甚至可以由 2' - 脱氧胸苷残基组成,这降低了 RNA 合成的成本并且可以增强 siRNA 在细胞培养基和所转染的细胞中的核酸酶抗性(参见 Elbashir et al., Nature 411:494-8, 2001)。在本发明的某些实施方案中也可以使用具有 50、75、100 或甚至 500 个碱基对或更多碱基对的较长的 dsRNA。示例性的用于实现 RNAi 的 dsRNA 浓度为约 0.05nM、0.1nM、0.5nM、1.0nM、1.5nM、25nM 或 100nM,但是根据所处理的细胞的性质、基因靶标和本领域技术人员容易理解的其它因素,也可以使用其它浓度。示例性的 dsRNA 可以是化学合成的或使用合适的表达载体在体外或体内产生的。示例性的合成 RNA 包括使用本领域已知的方法化学合成的 21 个核苷酸的 RNA(例如,Expedite RNA 亚磷酰胺和胸苷亚磷酰胺(Proligo, Germany)。合成寡核苷酸优选地使用本领域已知的方法进行脱保护和凝胶纯化(参见,例如,Elbashir et al., Genes Dev. 15:188-200, 2001)。较长的 RNA 可以转录自本领域已知的启动子,例如 T7RNA 聚合酶启动子。置于体外启动子下游的两个可能方向的单一 RNA 靶标能转录所述靶标的两条链,从而产生所需靶序列的 dsRNA 寡核苷酸。任何上述 RNA 种类应被设计为包括靶核酸中表示的核酸序列的一部分,例如,在严格条件和 / 或生理条件下与编码人源酸性神经酰胺酶或人源 ChoK 的多核苷酸杂交的核酸。

[0138] 在设计寡核苷酸中所使用的特异性序列可以是包含在靶标所表达的基因信息中的核苷酸的任何连续序列。本领域已知的程序和算法可以用于选择合适的靶序列。此外,可以如下选择最佳序列:使用设计用于预测具体单链核酸序列的二级结构的程序,并允许选择那些可能出现于折叠的 mRNA 的暴露的单链区的序列。用于设计合适的寡核苷酸的方法和组合物可见于,例如,美国专利第 6,251,588 号,通过引用将其并入本文。信使 RNA (mRNA) 通常被认为是直链分子,其在核糖核苷酸序列中含有指导蛋白合成的信息,然而研究发现存在与大部分 mRNA 中的多种二级和三级结构。RNA 中的二级结构单元通常由同一 RNA 分子的不同区之间的 Watson-Crick 型相互作用形成。重要的二级结构单元包括分子内双链区、发夹环、双链体 RNA 中的膨出和内部环。当二级结构单元彼此接触或与单链区接触时形成三级结构单元,从而产生更复杂的三维结构。很多研究人员测定了大量 RNA 双链体结构的结合能并且推导出一套可用于预测 RNA 的二级结构的法则(参见,例如,Jaeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706, 1989; 和 Turner et al., Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17:167, 1988)。所述法则可用于鉴定 RNA 结构单元,并且特别是用于鉴定可以代表能够被沉默 RNAi、核酶或反义技术靶向的 mRNA 的优选节段的单链 RNA 区。因此,可以鉴定 mRNA 靶标的优选节段,用于设计诱导 RNAi 的 dsRNA 寡核苷酸以及设计本发明的合适的核酶和锤头状核酶组合物。

[0139] 数种不同类型的分子已有效用于 RNAi 技术。小干扰 RNA (siRNA) 有时被称为短干扰 RNA 或短沉默 RNA,它是一类长度为 20-25 个核苷酸的双链 RNA 分子,其在生物学中发挥多种作用。最值得注意的是,siRNA 参与 RNA 干扰 (RNAi) 途径,其中 siRNA 干扰特定基因的

表达。siRNA 除了在 RNAi 途径中发挥功能之外,还作用于 RNAi 相关途径,例如,作为抗病毒机制或基因组染色体结构的成形。合成的 siRNA 已证实能够诱导哺乳动物细胞中的 RNAi。该发现引起将 siRNA/RNAi 用于生物医药研究和药物开发的热潮。

[0140] 微小 RNA(miRNA) 是相关类别的基因调节小 RNA,长度通常为 21-23nt。其通常不同于 siRNA,原因在于微小 RNA 是从单链 RNA 前体加工而来,并且与 mRNA 靶标仅表现出部分互补。最初的研究表明,miRNA 对基因表达的调节是转录后在细胞质中的处理小体(P-Bodies)在翻译抑制水平上的调节。然而,miRNA 也可以与 siRNA 相似地引导 mRNA 切割。这通常是对植物而言,在植物靶位点通常与 miRNA 高度互补。植物 mRNA 中的靶位点可见于 5' UTR、开放读码框和 3' UTR,而在动物中,主要靶标是 3' UTR。miRNA 首先转录为初级 microRNA(pri-miRNA)的一部分。然后,由 Drosha 在 Pasha/DGCR8(=微加工体复合物)的辅助下将 pri-miRNA 加工为前 miRNA(pre-miRNA)。然后,由输出蛋白-5(exportin-5)将 ca. 75nt 前 miRNA 输出到胞浆,在胞浆中再被 Dicer 切为 21-23nt siRNA 样分子。某些情况下,在 pri-miRNA 上可以发现多个 miRNA。

[0141] 短发夹 RNA(shRNA) 是另一种可用于实现 RNAi 的 RNA。短发夹 RNA 是形成可用于沉默基因表达的紧密发夹形转弯的 RNA 序列。shRNA 由 RNA 聚合酶 III 转录。

[0142] 目前,短干扰 RNA(siRNA) 和短发夹 RNA(shRNA) 被广泛用于沉默各种基因,从而沉默所述基因所发挥的功能。由于通过使用多种资源得到的已有的 shRNA 和 siRNA 基因沉默构建体文库的发展,现已能更容易地利用 RNAi 沉默具体基因。例如,由 shRNA 相关信息的数据和相关网站构成的 RNAi Codex 已被发展为公众获取 shRNA 资源的门户并且可访问 <http://codex.cshl.org>。RNAi Codex 目前提供来自 Hannon-Elledge shRNA 文库的数据并允许使用生物学家熟悉的基因名称来获取能沉默感兴趣的基因的 shRNA 构建体的信息。其被设计为提供使用者贡献的对于每个构建体的评注和出版物,但是必须是这些数据已经公开的情况下。Olson et al. (Nucleic Acids Res. 34(数据库期号):D153-D157, 2006,通过引用并入本文)提供了关于 RNAi Codex 的特征的详细描述并解释了该工具的使用。所有这些信息可用于帮助设计靶向于酸性神经酰胺酶、胆碱激酶或其他目的蛋白的不同的 siRNA 或 shRNA。

[0143] 酸性神经酰胺酶或胆碱激酶特异性核酶

[0144] 设计用于催化切割靶 mRNA 转录物的核酶分子也可用于阻止酸性神经酰胺酶和/或胆碱激酶 mRNA 的翻译。因此,在另一实施方案中,本发明组合物包含特异性地定向于酸性神经酰胺酶和/或胆碱激酶 mRNA 的核酶。核酶是能够催化 RNA 的特异性切割的酶 RNA 分子。(关于综述,参见 Current Biology 4:469-471,1994)。核酶作用的机制涉及核酶分子与互补靶 RNA 的序列特异性杂交,然后发生核苷酸内切割。核酶分子的组合物优选包括与靶 mRNA 互补的一个或多个序列和负责 mRNA 切割的公知催化序列或功能等同序列(参见,例如,美国专利第 5,093,246 号,通过引用将其整体并入本文)。

[0145] 虽然在位点特异性识别序列切割 mRNA 的核酶可以用于破坏靶 mRNA,但是优选使用锤头状核酶。锤头状核酶在与靶 mRNA 形成互补碱基对的侧翼区所指示的位置切割 mRNA。优选地,靶 mRNA 具有以下两个碱基的序列:5'-UG-3'。锤头状核酶的构建和制备是本领域公知的并且更全面地描述于 Haseloff and Gerlach, Nature 334:585-591,1988;并且可参见 PCT 专利申请第 W089/05852 号,通过引用将以上文献的内容并入本文。锤头状核酶序

列可以嵌入诸如转移 RNA (tRNA) 的稳定 RNA 以增加体内切割效率 (Perriman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 :6175-79, 1995 ;de Feyter, and Gaudron, Methods in Molecular Biology (分子生物学方法), Vol. 74, Chapter 43, "Expressing Ribozymes in Plants (植物中核酶表达)," Edited by Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N. J.)。具体而言, RNA 聚合酶 III 介导的 tRNA 融合核酶的表达是本领域公知的 (参见, Kawasaki et al., Nature 393 :284-9, 1998 ;Kuwabara et al., Nature Biotechnol. 16 :961-5, 1998 ;和 Kuwabara et al., Mol. Cell. 2 :617-27, 1998 ;Koseki et al., J Virol 73 :1868-77, 1999 ;Kuwabara et al., Proc Natl Acad Sci USA 96 :1886-91, 1999 ;Tanabe et al., Nature 406 :473-4, 2000)。通常, 给定靶 CDNA 序列中存在多个潜在锤头状核酶切割位点。优选地, 对核酶进行基因工程, 使得切割识别位点的位置在靶 mRNA 的 5' 末端附近, 从而增加效率并且最小化非功能性 mRNA 转录物的细胞内积累。此外, 使用位于编码诸如靶标的长和短的形式靶标的 C 末端氨基酸结构域不同部分的靶序列中的任何切割识别位点可允许所述靶标的一种或另一种形式的选择性靶定, 并且因此具有对于靶基因产物的一种形式的选择性作用。

[0146] 基因靶向核酶必须含有与两个区互补的杂交区, 所述两个区中的每一个的长度为靶 mRNA 的至少 5 个和优选地具有 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续核苷酸, 所述靶 mRNA 例如酸性神经酰胺酶或胆碱激酶基因中所表示的序列的 mRNA。此外, 核酶具有高度特异性核糖核酸内切酶活性, 其自动催化地切割靶有义 mRNA。本发明涉及与编码诸如治疗药物靶候选基因的靶基因的有义 mRNA 杂交的核酶, 从而与所述有义 mRNA 杂交并将其切割, 使得所述有义 mRNA 不再能被翻译而合成功能性多肽产物。

[0147] 本发明组合物中使用的核酶还包括 RNA 核糖核酸内切酶 (下文中为 "Cech 型核酶"), 例如天然存在于嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 中的一种 RNA 核糖核酸内切酶 (称为 IVS 或 L-19 IVS RNA) 并且其已被 Thomas Cech 及合作者详细描述 (Zaug et al., Science 224 :574-578, 1984 ;Zaug et al., Science 231 :470-475, 1986 ;Zaug et al., Nature 324 :429-433, 1986 ;University Patents Inc. 的公布的第 W088/04300 号国际专利申请 ;Been, et al., Cell 47 :207-216, 1986)。Cech 型核酶具有 8 个碱基对的活性位点, 其与靶 RNA 序列杂交, 然后发生靶 RNA 的切割。本发明包括靶向于存在于靶基因或核酸序列中的 8 个碱基对的活性位点序列的那些 Cech 型核酶。

[0148] 核酶可以由修饰的寡核苷酸构成 (例如, 为了改进的稳定性、靶向性等) 并且应当被体内递送到表达靶基因的细胞。递送的优选方法涉及使用在强组成型 pol III 或 pol II 启动子的控制下 "编码" 所述核酶的 DNA 构建体, 使得转染的细胞可产生足够量的核酶, 从而破坏内源靶信息并抑制翻译。因为与反义分子不同, 核酶是催化性的, 所以需要较低的细胞内浓度就可发挥功效。

[0149] 在某些实施方案中, 可以通过首先鉴定足以引起有效 RNAi 抑制的序列部分来设计核酶。然后, 可以将相同序列部分合并入核酶。在本发明的该方面, 核酶或 RNAi 的基因靶向部分为基本相同的序列, 所述序列为靶核酸的至少 5 个和优选地 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 或更多连续核苷酸, 所述靶核酸例如人源酸性神经酰胺酶或胆碱激酶序列中任何一个的核酸。在长的靶 RNA 链中, 很多靶位点不能被核酶接近, 这是因为它们隐藏在二级或三级结构中 (Birikh et al., Eur J Biochem 245 :1-16, 1997)。为

了克服靶 RNA 可及性的问题,计算机生成的对于二级结构的预测被通常用于鉴定最可能是单链的或具有“开放”构型的靶标(参见 Jaeger et al., *Methods Enzymol* 183:281-306, 1989)。其它方法利用系统性方法来预测包含接近大量候选杂交寡核苷酸分子的二级结构(参见 Milner et al., *Nat Biotechnol* 15:537-41, 1997; 和 Patzel and Sczakiel, *Nat Biotechnol* 16:64-8, 1998)。此外,美国专利第 6,251,588 号描述了评价寡核苷酸探针序列从而预测与靶核酸序列杂交的可能性的方法,将该专利的内容并入本文。本发明的方法提供在设计本发明的 RNAi 寡核苷酸和核酶中使用该方法来选择靶 mRNA 序列的被预测为单链的优选节段并进一步用于相同或基本同一的靶 mRNA 序列的条件性应用,所述优选节段优选地包含靶 mRNA 的约 10-20 个连续核苷酸。

[0150] 酸性神经酰胺酶或胆碱激酶特异性反义核酸

[0151] 本发明的另一方面涉及使用分离的“反义”核酸来抑制表达,例如通过抑制酸性神经酰胺酶和/或胆碱激酶核酸的转录和/或翻译来抑制表达。反义核酸可以通过常规碱基对互补性与潜在药物靶标结合,或者例如在与 DNA 双链体结合的情况下,反义核酸可以通过双螺旋的大沟中的特异性相互作用与潜在药物靶标结合。通常,这些方法是指本领域中通常使用的技术范围,并且包括依赖于与寡核苷酸序列的特异性结合的任何方法。

[0152] 例如,本发明的反义构建体可以作为表达质粒进行递送,所述表达质粒当在细胞中转录时,产生与编码 ChoK 多肽或酸性神经酰胺酶多肽的细胞 mRNA 的至少特有部分互补的 RNA。可选地,反义构建体是寡核苷酸探针,所述探针是离体制备的,并且当被引入细胞时能通过靶核酸的 mRNA 和/或基因组序列杂交来引起表达抑制。该寡核苷酸探针优选为能抵抗诸如核酸外切酶和/或核酸内切酶的内源核酸酶的修饰的寡核苷酸,并因此在体内是稳定的。用作反义寡核苷酸的示例性的核酸分子是 DNA 的氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和甲基磷酸酯类似物(也可参见美国专利第 5,176,996 号、第 5,264,564 号和第 5,256,775 号)。此外,构建在反义治疗中有用的寡聚物的一般方法可参见综述,例如, Van der Krol et al., *BioTechniques* 6:958-976, 1988; 和 Stein et al., *Cancer Res* 48:2659-2668, 1988。

[0153] 关于反义 DNA,优选来源于翻译起始位点的寡脱氧核糖核苷酸,所述翻译起始位点例如在靶基因的 -10 和 +10 区之间。反义方法包括设计与编码靶多肽的 mRNA 互补的寡核苷酸(DNA 或 RNA)。反义寡核苷酸会与 mRNA 转录物结合并阻止翻译。尽管优选绝对互补,但这并不是必需的。对于双链反义核酸而言,可以测试双链体 DNA 的单链或可以分析三链体形成。杂交的能力取决于互补程度和反义核酸长度二者。通常,杂交核酸越长,其可能含有更多的与 RNA 的碱基错配并仍能形成稳定的双链体(或三链体,视情况而定)。本领域技术人员通过使用标准步骤来确定杂交复合物的熔点能够确保可接受的错配程度。

[0154] 与 mRNA 的 5' 末端互补的寡核苷酸应当最有效地发挥抑制翻译的作用,所述 5' 末端例如直至并包括 AUG 起始密码子的 5' 非翻译序列。然而,与 mRNA 的 3' 非翻译序列互补的序列最近被证实也能有效抑制 mRNA 的翻译(Wagner, *Nature* 372:333, 1994)。因此,与基因的 5' 或 3' 非翻译、非编码区互补的寡核苷酸可用于反义方法来抑制该 mRNA 的翻译。与 mRNA 的 5' 非翻译区互补的寡核苷酸应当包括 AUG 起始密码子的互补物。与 mRNA 编码区互补的反义寡核苷酸是效率较低的翻译抑制剂,但是也可以用于本发明。无论反义核酸被设计为与 mRNA 的 5'、3' 或编码区杂交,反义核酸的长度都应为至少 6 个核苷酸,优选长

度少于约 100 个核苷酸,并且更优选少于 50、25、17 或 10 个核苷酸。

[0155] 优选地,首先进行体外研究来量化反义寡核苷酸抑制基因表达的能力。优选地,这些研究利用能在寡核苷酸的反义基因抑制和非特异性生物效应之间区分的对照。还优选地,这些研究将靶 RNA 或蛋白的水平与内部对照 RNA 或蛋白的水平进行比较。可以将使用反义寡核苷酸获得的结果与使用对照寡核苷酸获得的结果进行比较。优选地,对照寡核苷酸与测试寡核苷酸具有大致相同的长度,并且寡核苷酸的核苷酸序列与反义序列的差别不多于阻止与靶序列特异性杂交所必需的差别。

[0156] 反义寡核苷酸可以是 DNA 或 RNA 或其嵌合混合物或衍生物或修饰的形式,可以是单链的或双链的。可以在碱基部分、糖部分或磷酸主链修饰寡核苷酸,例如,为了改进分子的稳定性、杂交等。寡核苷酸可以包括其它附加基团,例如肽(例如,为了靶向于宿主细胞受体)或便于转运跨过细胞膜(参见,例如,Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :6553-6556, 1989 ;Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84 :648-652, 1987 ; PCT 公开第 W088/09810 号)或血脑屏障(参见,例如,PCT 公开第 W089/10134 号)的试剂,杂交触发的切割剂(参见,例如,Krol et al., BioTechniques 6 :958-976, 1988)或插入剂(参见,例如,Zon, Pharm. Res. 5 :539-549, 1988)。为了这个目的,寡核苷酸可以与另一分子共轭,所述另一份子例如肽、杂交触发交联剂、转运剂、杂交触发切割剂等。

[0157] 反义寡核苷酸可以包含至少一个修饰的碱基部分,所述修饰的碱基部分选自,但不限于,5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟基三乙基(carboxyhydroxytiethyl))尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基 Q 苷、肌苷、N6-异戊稀腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基 Q 苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫-N6-异戊稀腺嘌呤、尿嘧啶-5-羧乙酸(v)、wybutoxosine、假尿嘧啶、Q 苷、2-巯基胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-羧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-羧乙酸(v)、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)_w 和 2,6-二氨基嘌呤。

[0158] 反义寡核苷酸还可以包含至少一个修饰的糖部分,所述修饰的糖部分选自,但不限于,阿拉伯糖、2-氟阿拉伯糖、木酮糖和己糖。反义寡核苷酸还可以含有中性肽样主链。此类分子被称为肽核酸(PNA)-寡聚物并描述于,例如Perry-O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 :14670, 1996 和 Eglom et al., Nature 365 :566, 1993。PNA 寡聚物的一个优势在于:由于 DNA 的中性主链,PNA 寡聚物具有基本不依赖于介质的离子强度而与互补 DNA 结合的能力。在另一实施方案中,反义寡核苷酸包含至少一个修饰的磷酸酯主链,所述磷酸主链选自硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硫代磷酸酰胺酯、氨基磷酸酯、二氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、烷基磷酸三酯和甲酰基(formacetal)、或以上的类似物。

[0159] 在另一实施方案中,反义寡核苷酸是 α -异头寡核苷酸。 α -异头寡核苷酸与互补 RNA 形成特异性双链杂交体,其中与通常的反平行方向不同,链彼此平行(Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15 :6625-6641, 1987)。寡核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15 :6131-6148, 1987)或嵌合 RNA-DNA 类似物(Inoue et al., FEBS

Lett. 215 :327-330, 1987)。

[0160] 虽然可以使用与靶 mRNA 序列编码区互补的反义核苷酸,但是也可以使用与转录的非翻译区互补的那些反义核苷酸。

[0161] 在某些情况下,难以实现反义的细胞内浓度足以抑制内源 mRNA 的 翻译。因此优选的方法利用重组 DNA 构建体,其中反义寡核苷酸受强 pol III 或 pol II 启动子的控制。使用这样的构建体来转染靶细胞会实现足够量的单链 RNA 的转录,所述单链 RNA 会与内源潜在药物靶转录物形成互补碱基对,并从而阻止翻译。例如,可以引入载体,使得所述载体被细胞摄取并指导反义 RNA 的转录。这样的载体可以仍然是游离型的或变为染色体整合的,只要其可以被转录而产生所需的反义 RNA。可以通过本领域标准的重组 DNA 技术方法构建此类载体。载体可以是用于在哺乳动物细胞中复制和表达的质粒、病毒或本领域已知的其他载体。编码反义 RNA 的序列的表达可以通过在哺乳动物中有效的、优选在人细胞中有效的本领域已知的任何启动子。这些启动子可以是诱导型的或组成型的。这些启动子包括但不限于:SV40 早期启动子区 (Bernoist and Chambon, Nature 290 :304-310, 1981)、劳斯肉瘤病毒的 3' 长末端重复中包含的启动子 (Yamamoto et al., Cell 22 :787-797, 1980)、疱疹胸苷激酶启动子 (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 :1441-1445, 1981)、金属硫蛋白基因的调节序列 (Brinster et al, Nature 296 :39-42, 1982) 等。可以将任何类型的质粒、粘粒、YAC 或病毒载体用于制备可以被直接引入组织部位的重组 DNA 构建体。

[0162] 可选地,可以通过靶向于与基因的调节区(即启动子和/或增强子)互补的脱氧核糖核苷酸序列来形成三螺旋结构从而降低靶基因表达,所述三螺旋结构阻止体内靶细胞内基因的转录(通常参见, Helene, Anticancer Drug Des. 6(6) :569-84, 1991; Helene et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 660 :27-36, 1992; 和 Maher, Bioassays 14(12) :807-15, 1992)。

[0163] 在用于抑制转录的三螺旋形成中使用的核酸分子优选为单链的,并且由脱氧核糖核苷酸组成。这些寡核苷酸的碱基组成应当通过 Hoogsteen 碱基配对法则促进三螺旋形成,其通常需要相当大段的嘌呤或嘧啶存在于双链体的一条链上。核苷酸序列可以是基于嘧啶的,这会导致 TAT 和 CGC 三联体跨过得到的三螺旋的三条相关链。富含嘧啶的分子以与双链体单链平行的方向提供与该双链体单链富含嘌呤区的碱基互补性。此外,可以选择富含嘌呤的核酸分子,例如,含有一段 G 残基的核酸分子。这些分子会与富含 GC 对的 DNA 双链体形成三螺旋,其中大部分的嘌呤 残基位于所靶向的双链体的单链上,这导致 CGC 三联体跨过三链体中的三条链。

[0164] 可选地,通过产生所谓的“Z 字型 (switchback)”核酸分子可以增加能成为三螺旋形成靶标的潜在的靶序列。Z 字型分子是以变换 5' -3'、3' -5' 的方式合成,这使得它们首先与双链体的一条链碱基配对,然后与另一条链碱基配对,这使得不再必须有相当大段的嘌呤或嘧啶存在于双链体的一条链上。

[0165] 在某些实施方案中,反义寡核苷酸吗啉代反义。吗啉代是合成的分子,它是重新设计天然核酸结构的产物。通常长度为 25 个碱基,它们通过标准核酸碱基配对与 RNA 互补序列结合。从结构上说,吗啉代和 DNA 的区别是:尽管吗啉代具有标准核酸碱基,那些碱基与吗啉环结合而不是与脱氧核糖环结合,并且那些碱基是通过磷二酰胺基连接而不是通过磷酸酯连接。用不带电的磷二酰胺基替代阴离子磷酸酯消除了通常生理 pH 范围内的离子化,所以生物体或细胞中的吗啉代是不带电的分子。吗啉代不是嵌合寡聚物;吗啉代的整个主

链由这些修饰的亚基构成。吗啉代最常被用作单链寡聚物,但是吗啉代链和互补 DNA 链的异双链可以与阳离子细胞溶质递送试剂联合使用。

[0166] 与很多反义结构种类(例如,硫代磷酸酯)不同,吗啉代不降解其靶 RNA 分子,而是通过“空间阻断”发挥作用,其与 RNA 中的靶序列结合并简单地干扰可能与该 RNA 相互作用的分子。吗啉代寡聚物通常被用于研究胚胎中特异 mRNA 转录物的作用,所述胚胎例如产生吗啉代突变体胚胎的斑马鱼、非洲爪蟾(African clawed frog)(非洲蟾蜍(Xenopus))、鸡和海胆的卵或胚胎。在伴随合适细胞溶质递送系统的情况下,吗啉代在细胞培养物中是有效的。

[0167] 通过与信使 RNA(mRNA)的 5' 非翻译区结合,吗啉代可以干扰核糖体起始复合物从 5' 帽前进至起始密码子。这阻止了所靶向的转录物的编码区的翻译(被称为“抑制”基因表达)。吗啉代提供了便捷的手段来蛋白抑制表达和了解该抑制如何改变细胞或生物体。某些吗啉代能有效地抑制表达,使得在先前存在的蛋白被降解后,通过 Western 印迹无法检测到所靶向的蛋白。

[0168] 吗啉代还可以干扰 pre-mRNA 加工步骤,通常是通过阻止指导剪接的 snRNP 复合物在 pre-RNA 的链上的内含子边界与其靶标结合。阻止 U1(位于供体位点)或 U2/U5(位于多嘧啶部分和接受体位点)的结合可以造成改动的剪接,这通常会导致外显子被排除在成熟 mRNA 之外。靶向于某些剪接靶标导致了包含内含子,而隐藏剪接位点的激活可以导致部分包含或排除。还可以阻断 U11/U12 snRNP 的靶标。通过逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)可以方便地检测剪接修饰,并且 RT-PCR 产物的凝胶电泳后可观察到条带迁移。

[0169] 吗啉代还被用于阻断 miRNA 活性、核酶活性、内含子剪接沉默子和剪接增强子。吗啉代抑制 U2 和 U12 snRNP 的功能。靶向于蛋白编码区内的“光滑(slippy)”mRNA 序列的吗啉代可以诱导翻译移码。吗啉代对于该类靶标的活性提示吗啉代可被用作阻断蛋白或核酸与 mRNA 相互作用的多用途工具。

[0170] 酸性神经酰胺酶或胆碱激酶特异性 DNA 酶

[0171] 本发明的另一方面涉及组合物,其中酸性神经酰胺酶抑制剂和/或胆碱激酶抑制剂是 DNA 酶。DNA 酶合并了反义和核酶技术的部分机制特征。设计 DNA 酶,使得它们与反义寡核苷酸很相似地识别具体靶核酸序列,而与核酶很相似地催化性地和特异性地切割靶核酸。

[0172] 目前有两种基本类型的 DNA 酶,并且这两种 DNA 酶都是由 Santoro 和 Joyce 鉴定的(参见,例如,美国专利第 6,110,462 号)。10-23 DNA 酶包含连接两个臂的环状结构。所述两个臂通过识别具体靶核酸序列而提供特异性,而所述环状结构在生理条件下提供催化功能。

[0173] 简言之,为了设计特异性地识别和切割靶核酸的理想的 DNA 酶,本领域技术人员必须首先鉴定特有的靶序列。使用与对于反义寡核苷酸所列出的相同的方法可以实现这点。优选地,所述特有的或基本上的序列是富含 G/C 的约 18-22 个核苷酸。高 G/C 含量有助于确保 DNA 酶和靶序列之间较强的相互作用。

[0174] 当合成 DNA 酶时,将酶靶向于信使的特异性反义识别序列是分开的,使得其包含 DNA 酶的两条臂,并且 DNA 酶环位于两条特异性臂之间。

[0175] 制备和给予 DNA 酶的方法可见于,例如,美国专利第 6,110,462 号。相似地,如上

文详述,体外或体内递送 DNA 核酶的方法包括递送 RNA 核酶的方法。此外,本领域技术人员应当意识到,与反义寡核苷酸相似,可以任选地修饰 DNA 酶以增进稳定性和对降解的抗性。

[0176] 可以通过本领域已知的合成 DNA 和 RNA 分子的任何方法来制备本发明的反义 RNA 和 DNA、核酶、RNAi 和三螺旋分子。这些方法包括本领域公知的化学合成寡脱氧核糖核苷酸和寡核糖核苷酸的技术,例如,固相亚磷酸胺化学合成。可选地,可以通过编码反义 RNA 分子的 DNA 序列的体外和体内转录产生 RNA 分子。该 DNA 序列可以被合并入多种载体中,所述载体合并了合适的 RNA 聚合酶启动子,例如 T7 或 SP6 聚合酶启动子。可选地,可以将根据所使用的启动子以组成型或诱导型方式合成反义 RNA 的反义 cDNA 构建体稳定引入细胞系。此外,作为增加细胞内稳定性和半衰期的手段,可以引入对于核酸分子的各种公知的修饰。可能的修饰包括但不限于,向分子的 5' 和 / 或 3' 端添加核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的侧翼序列或在寡脱氧核糖核苷酸主链中使用硫代磷酸酯或 2' O- 甲基而不使用磷酸二酯酶连接。

[0177] ChoK 抑制剂和酸性神经酰胺酶抑制剂的优选的组合包括 MN58b (结构提供在表 1 的第 II 行中) 与 NOE (结构提供在表 2 的第 6 行中)、RSM-932A (结构提供在表 1 的第 I 行中) 与 NOE、MN58b 与 D-NMAPPD (结构提供在表 2 的第 VIII 行中) 和 RSM-932A 与 D-NMAPPD。

[0178] ChoK抑制剂和化疗剂的组合(本发明第二组合物)

[0179] 本发明的发明人出乎意料地发现:对 ChoK 抑制剂 MN58b 治疗的抗性与对于诸如顺铂、泰素、长春瑞滨或吉西他滨的常规化疗剂的抗性不相关。在对 ChoK 抑制剂具有抗性的肿瘤(参见实施例 1)以及在通过在 ChoK 抑制剂的存在下的重复的生长循环而选择的建立的肿瘤细胞系(参见本发明实施例 6)中都观察到这点。不希望被任何理论所限制,认为 ChoK 抑制剂和顺铂之间非交叉的抗性是由于两种药物通过不同的机制发挥作用。无论是在体外和体内异种移植模型中测试时(参见本发明实施例 7),ChoK 抑制剂和顺铂的组合,与使用单独化合物进行治疗相比,都导致了肿瘤细胞的生长抑制中的协同效应(参见本发明实施例 7),这支持了上述假设。此外,本发明的发明人还观察到:当在不同结肠癌细胞系中测试时,胆碱酯酶抑制剂和 5- 氟尿嘧啶的联合使用导致了协同抗肿瘤效应(参见实施例 9)。

[0180] 因此,在另一方面,本发明涉及组合物(下文中本发明第二组合物),其包含第一组分或第二组分、或者包含第一组分和第二组分,所述第一组分包含一种或多种 ChoK 抑制剂,所述第二组分包含一种或多种化疗剂。

[0181] 术语“组合物”是指按照本发明的可选实施方案进行不同组合的一种或多种化合物。优选地,所述组合物包含至少一种 ChoK 抑制剂和至少一种烷化剂。

[0182] 适于在本发明组合物中使用的 ChoK 抑制剂包括先前表 1 中所示的任何 ChoK 抑制剂,正如构成本发明第一组合物的一部分。在优选实施方案中,所述 ChoK 抑制剂是 ChoK α 的特异性抑制剂。

[0183] 本文所用的术语“化疗剂”是指抑制癌细胞的增殖、生长、寿命或转移活性的化学试剂,并且包括但不限于,DNA 烷化药物、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、蒽环类抗生素、拓扑异构酶 I 和 II 抑制剂、激素治疗和靶向治疗,所述靶向治疗例如 EGFR 抑制剂西妥昔单抗、吉非替尼或蛋白酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼。在优选实施方案中,所述化疗剂是烷化剂,并且更具体而言是 DNA 烷化剂或抗代谢物。

[0184] 本文所用的表达“烷化剂”涉及能够向快速分裂的细胞的遗传物质添加烷基残基，从而导致复制逮捕和细胞死亡的化合物。这类试剂包括基于铂的化合物、氮芥、亚硝基脲、乙撑亚胺衍生物、烷基磺酸盐和三氮烯，所述三氮烯包括但不限于，双氯乙基甲胺、环磷酰胺 (CytosanTM)、美法仑 (L-沙可来新)、依托泊苷、卡莫司汀 (BCNU)、洛莫司汀 (CCNU)、司莫司汀 (甲基-CCNU)、链脲霉素、氯脲霉素、尿嘧啶氮芥、恩比兴、异磷酰胺、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、三亚胺嗪、三乙烯硫代磷胺、白消安、丙卡巴肼、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0185] 在优选实施方案中，所述烷化剂是基于铂的化合物。可以在本发明中使用的示例性的基于铂的化合物包括但不限于，顺铂，碳铂，异丙铂，四铂，奥沙利铂，JM118，JM149，JM216，JM335，反铂，顺式、反式、顺式-Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)(O₂CC₃H₇)₂Cl，奈达铂，丙二酸-1,2-二氨基环己烷铂(II)，5-磺基水杨酸-反式-(1,2-二氨基环己烷)铂(II)(SSP)，聚-[(反式-1,2-二氨基环己烷)铂]-羧基直链淀粉(POLY-PLAT)和4-羟基-磺酰基苯基乙酸酯(反式-1,2-二氨基环己烷)铂(II)(SAP)。

[0186] 本文所用的术语“抗代谢物”在广义上涉及由于与对活生物体重要的代谢物(例如维生素、辅酶、氨基酸和糖)具有结构上或功能上的相似性而干扰正常代谢作用的物质和抑制电子转移系统从而阻止产生富有能量的中间物的物质。具有抗肿瘤活性的抗代谢物的实例包括但不限于，叶酸类似物(例如，甲氨蝶呤(methotrexate)(甲氨蝶呤(amethopterin)))、二甲叶酸、依达曲沙、甲氨蝶呤、诺拉曲塞、培美曲塞、吡曲克辛、蝶罗呤、雷替曲塞、曲美沙特；嘧啶类似物(例如，氟尿嘧啶(5-氟尿嘧啶;5-FU(R))、氟尿嘧啶脱氧核苷(floxuridine)(氟尿嘧啶脱氧核苷(fluorodeoxyuridine);FudR)、去氧氟尿苷和阿糖胞苷(cytarabine)(阿糖胞苷(cytosine arabinoside)))；嘌呤类似物(例如，巯基嘌呤(6-巯基嘌呤;6-MP)、硫鸟嘌呤(6-硫鸟嘌呤;TG)和喷司他丁(2'-脱氧助间型霉素))。

[0187] 优选的组合包括但不限于，MN58b与顺铂、RSM-932A与顺铂、MN58b与5-氟尿嘧啶和RSM-932A与5-氟尿嘧啶。

[0188] ChoK抑制剂和死亡受体配体的组合(本发明第三组合物)

[0189] 本发明的发明人已经证实：用死亡受体配体和ChoK抑制剂的组合处理肿瘤细胞，与单独用死亡受体配体或ChoK抑制剂处理相比，导致了增加的细胞增殖抑制。例如，如本发明实施例8所示，用胆碱激酶抑制剂RSM-932A(ChoKI)和TRAIL的组合处理结肠癌细胞，与单独使用每种化合物处理相同的细胞相比，导致了增加的细胞毒性。此外，本发明实施例8证实：ChoK抑制剂MN58b和TRAIL的联合使用导致了肿瘤异种移植模型中肿瘤生长的抑制，该抑制高于单独使用每种化合物时所观察到的抑制。

[0190] 因此，在另一方面，本发明涉及组合物，其包含第一组分或第二组分，或者包含第一组分和第二组分，所述第一组分包含一种或多种ChoK抑制剂，所述第二组分是一种或多种死亡受体配体。

[0191] 适于在本发明组合物中使用的ChoK抑制剂包括先前表1所示的任何ChoK抑制剂，正如构成本发明第一组合物的一部分。在优选实施方案中，所述ChoK抑制剂是ChoK α 的特异性抑制剂。

[0192] 适于在本发明组合物中使用的死亡受体配体包括NGF、CD40L、CD137L/4-1BBL、TNF- α CD134L/OX40L、CD27L/CD70、FasL/CD95、CD30L、TNF- β /LT- α 、LT- β 和TRAIL。在优

选实施方案中, TNF 家族成员是 TRAIL、TRAIL 的功能等同衍生物或 TRAIL 的小模拟化合物。TRAIL (TNF 相关凋亡诱导配体) 还称为“*Apo-2* 配体”、“*Apo-2L*”、“*Apo2L*”、“*Apo2L/TRAIL*”和“*Apo-2* 配体 /TRAIL”, TRAIL 是能够诱导表达 TRAIL 同族受体的细胞中凋亡的分子。数年前, TRAIL 被鉴定为细胞因子的 TNF 家族的成员 (Pitti et al., 1996, J. Biol. Chem., 271: 12687-12690 和美国专利第 6, 284, 236 号)。全长天然序列人源 TRAIL 多肽长度为 281 个氨基酸, 是具有如 SEQ ID NO: 7 所示的序列的 II 型跨膜蛋白 (UniProt 登录号 P50591)。可溶形式的 TRAIL 的晶体学研究表现出与 TNF 和其他相关蛋白的结构相似的同三聚体结构。但是, 与其它 TNF 家族成员不同, 发现 TRAIL 具有特有的结构特征, 该特征为 3 个半胱氨酸残基 (位于同三聚体中每个亚基的位置 230) 共同与锌原子配位, 并且锌结合对于三聚体稳定性和生物活性是重要的。本发明考虑到使用 3 种不同 TRAIL 异形体 (TRAIL α 、TRAIL β 和 TRAIL γ) 中的任意一种或其组合。

[0193] 功能等同 TRAIL 变体包括: 诸如 W008088582 和 US6284236 中所述的可溶性 TRAIL 异形体或 US2002128438 中所述的 TRAIL 片段 95-281, 114-281; Bremer et al (Neoplasia, 2004, 6: 636-45) 所述的 scFv :sTRAIL 融合; US2002061525 中所述的备选剪接形式的 TRAIL; W004101608 中所述的 TRAIL- 受体结合肽; 具有对于促凋亡受体的增加的特异性的 TRAIL 变体, 例如 W007063301 中所述的 191L、199V、201R、213W、215D 和 / 或 193S TRAIL 突变体或如 W004001009A 中所述的通过对于受体的噬菌体展示选择的变体; 针对 TRAIL- 同族受体 TRAIL-R1 (DR4) 和 TRAIL-R2 (DR5) 的拮抗抗体, 例如马帕木单抗 (mapatumumab)、来沙木单抗 (exatumumab)、W007128231 中所述的抗体或 W002094880 中所述的抗体、W006017961 中所述的单克隆抗体 AD5-10、W005056605 中所述的 TRAIL- 特异性串联双链抗体和三链抗体、W09937684 中所述的嵌合抗 DR4 抗体、W003038043 中所述的拮抗性抗 DR5 抗体、W002085946 中所述的双特异性抗 TRAIL 受体抗体、W09832856 中所述的抗 DR4 特异性抗体、Park, K. J et al (Cancer Res., 2007, 67: 7327-7334) 所述的抗 DR2ScFV; W008025516 和 W004014951 中所述的三聚体 TRAIL 融合蛋白; W007102690 中所述的十二聚体 TRAIL 变体; W007145457 中所述的聚乙二醇化的 TRAIL; 包含编码 TRAIL 的多核苷酸的 DNA 载体, 例如 US2006153809、W004087930、US2005031593 中所述的那些载体。

[0194] 具有促凋亡作用的小分子 TRAIL 模拟物包括 W02008094319 中所述的化合物。

[0195] 优选的组合包括但不限于, RSM-932A 与人源 TRAIL 的胞外区 (氨基酸 95-281) 和 MN58b 与人源 TRAIL 的胞外区 (氨基酸 95-281)。

[0196] 本发明的药物制剂

[0197] 构成本发明第一、第二和第三组合物一部分的化合物不仅包括这样的化合物, 还包括所述化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、前药。术语“药学上可接受的盐、溶剂化物、前药”是指被给予接受体后能够 (直接或间接) 提供本文中所述化合物的任何药学上的盐、酯、溶剂化物或任何其它化合物。然而, 应当注意到, 药学上不可接受的盐也在本发明的范围内, 因为它们可用于制备药学上可接受的盐。可以通过本领域已知的方法进行盐、前药和衍生物的制备。

[0198] 例如, 通过常规化学方法从含有碱性或酸性残基的初始化合物合成本文中提供的化合物的药学上可接受的盐。例如, 通常通过使化合物的自由酸或碱形式与化学计量的水或有机溶剂或两者的混合物中合适的碱或酸进行反应制备这些盐。通常优选非水性介质,

例如 DMSO(二甲亚砜)、醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。酸加成盐的实例包括无机酸加成盐和有机酸加成盐,所述无机酸加成盐例如氯化物、溴化物、碘化物、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐,所述有机酸加成盐例如乙酸盐、马来酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、扁桃酸盐、甲烷磺酸盐和对甲苯磺酸盐。碱加成盐的实例包括无机盐和有机碱盐,所述无机盐例如钠盐、钾盐、溴化物、钙盐、铵盐、镁盐、铝盐和锂盐,所述有机碱盐例如乙二胺盐、乙醇胺盐、N, N-二烯基乙醇胺盐、三乙醇胺盐、葡萄糖胺盐和碱性氨基酸盐。

[0199] 特别优选的衍生物或前药为当被给予患者时能增加本发明化合物的生物利用度(例如,使口服给予的化合物更容易被血液吸收)或能增强初始物种相关的生物部位(例如,脑或淋巴系统)中初始化合物的释放的那些化合物。

[0200] 本发明还提供组合物,其中至少一种化合物是前药。术语“前药”以其最宽泛的意义使用,并且包括在体内转化为本发明化合物的那些衍生物。这些衍生物对于本领域技术人员显而易见的,并且根据分子中存在的官能团,可以包括但不限于本发明化合物的以下衍生物:酯、氨基酸酯、磷酸酯、金属盐、磺酸酯、氨基甲酸酯和酰胺。产生给定活性化合物的前药的方法的实例是本领域技术人员已知的,并且可见于例如 Krogsgaard-Larsen et al. “Textbook of Drug design and Discovery(药物设计和发现)”Taylor & Francis(2002 年 4 月)。

[0201] 本发明化合物可以是游离化合物或溶剂化物的晶体形式,并且意图将以上二者包括在本发明的范围内。溶剂化方法是本领域公知的。合适的溶剂化物是药学上可接受的溶剂化物。在具体实施方案中,所述溶剂化物是水合物。形成本发明组合物的化合物根据 C 上存在的手性中心可以包括对映体,或根据多重键的存在(例如, Z, E)可以包括异构体。单独的异构体、对映体或非对映异构体和它们的混合物包括在本发明的范围内。

[0202] 为本发明不同化合物所选择的不同取代基提供显著影响 log P 值一系列因素。因此,可以建立作为氢键供体和分子内或分子间连接的羟基,即使在酚类的情况下。羰基或羧基的存在产生分子内质子接受基团。卤素的存在产生非常不足的碳并且大大改动了生物学性质。氨基产生分子上良好的亲核基团,并且在大多数情况下显著改变其极性和极化性;另外的烷基和/或芳基的存在增加分子的亲油性。

[0203] 在另一方面,本发明提供包含本发明第一、第二或第三组合物,它们的药学上可接受的盐,衍生物,前药,溶剂化物或立体异构体以及用于对患者进行给药的药学可接受的载体,佐剂或介质的药物组合物。如本文所用的短语“药学可接受的载体”表示参与将主题试剂从机体的一个器官或部分携带或运送至机体的另一器官或部分的药学上可接受的材料、组合物或介质,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料。每种载体必须是“可接受的”,其意思是与制剂的其它成分是相容的。可以作为药学可接受的载体的物质的某些实例包括:(1) 糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2) 淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3) 纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和纤维素乙酸酯;(4) 粉末状黄耆胶;(5) 麦芽;(6) 明胶;(7) 滑石;(8) 赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;(9) 油,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10) 二醇,例如丙二醇;(11) 多元醇,例如丙三醇、山梨醇、甘露醇、聚乙二醇硬脂酸酯(soluto1)和聚乙二醇;(12) 酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13) 琼脂;(14) 缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15) 藻酸;

(16) 无热原水 ; (17) 等渗盐水 ; (18) 林格液 ; (19) 乙醇 ; (20) 磷酸盐缓冲液 ; 和 (21) 药物制剂中使用的其它无毒性相容物质, 例如 DMSO (二甲亚砜) 及其衍生物。

[0204] 可以通过任何合适的给药途径给予药物组合物, 例如口服途径、局部途径、直肠途径或肠胃外途径 (包括皮下途径、腹膜内途径、皮内途径、肌肉内途径和静脉内途径)。

[0205] 适于口服给药的药物形式包括任何固体组合物 (片剂、锭剂、胶囊剂、颗粒剂等) 或液体组合物 (溶液、悬液、乳液、糖浆等), 并且可以含有本领域已知的常规赋形剂, 例如结合剂, 例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨醇、黄蓍胶或聚乙烯吡咯酮; 填料, 例如乳糖、糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨醇或甘氨酸; 用于制备片剂的润滑剂, 例如硬脂酸镁; 崩解剂, 例如淀粉、聚乙烯吡咯酮、淀粉乙醇酸钠或微晶纤维素; 或药学上可接受的润湿剂, 例如月桂基硫酸钠。

[0206] 可以通过混合、填充或制备片剂的常规方法来制备固体口服组合物。可以使用重复的混合操作、通过使用大量填充剂将活性成分分布于整个组合物中。这些操作是本领域中常规的操作。可以通过例如湿法制粒或干法制粒的方法来制备片剂, 并且可以按照常规制药实践中公知的方法任选地对片剂进行包被, 特别是用肠衣进行包被。

[0207] 药物组合物还可以用于肠胃外给药, 例如合适的单位药物形式的无菌溶液、悬液或冻干产物。可以使用合适的赋形剂, 例如膨胀剂、缓冲剂或表面活性剂。可以使用常用方法制备所述制剂, 例如西班牙药典和美国药典以及相似参考文献中描述或引用的方法。

[0208] 可以通过任何合适的方法给予本发明中使用的化合物或组合物, 例如静脉内输注、口服制剂以及腹膜内给药和静脉内给药。尽管如此, 优选的给药途径取决于患者的疾病状态。由于对于患者来讲的舒适性和待治疗疾病的慢性特征, 因此优选口服给药。

[0209] 对于本发明组合物在治疗中的应用, 其优选为药学上可接受的形式或基本上纯的形式, 即除了药学上可接受的赋形剂之外并且不包括在正常剂量水平被认为是具有毒性的材料, 本发明组合物具有药学上可接受的纯度水平。酸性神经酰胺酶抑制剂或胆碱激酶抑制剂的纯度水平优选大于 50%、更优选大于 70%、更优选大于 90%。在优选实施方案中, 所述纯度水平大于 95%。

[0210] 本发明组合物中酸性神经酰胺酶抑制剂、化疗剂或死亡受体配体和胆碱激酶抑制剂的治疗有效量通常取决于待治疗的个体、所述个体所患疾病的严重程度、所选择的给药形式等因素。基于该原因, 本发明中所述的剂量必须视为是对本领域技术人员的指导, 并且本领域技术人员需要根据前述变量调整剂量。尽管如此, 酸性神经酰胺酶抑制剂可以每天给药一次或多次, 例如每天给药 1、2、3 或 4 次, 每天给药总量通常为 1-200mg/kg 体重 / 天, 优选 1-10mg/kg 体重 / 天。按照相同方式, 胆碱激酶抑制剂可以每天给药一次或多次, 例如每天给药 1、2、3 或 4 次, 每天给药总量通常为 1-200mg/kg 体重 / 天, 优选 1-10mg/kg 体重 / 天。

[0211] 可以将本发明的组合物配制为单一制剂, 或可选地, 可以将本发明的组合物提供为用于同时给药、合并给药、分别给药或相继给药的产品。

[0212] 本发明中所述的组合物、它们药学上可接受的盐、前药和 / 或溶剂化物、以及含有以上物质的药物组合物可以与其它另外的药物共同使用以提供联合治疗。所述另外的药物可以构成相同药物组合物的一部分, 或可选地, 以单独的组合物形式提供所述另外的药物, 以用于将其与包含酸性神经酰胺酶抑制剂和胆碱激酶抑制剂或它们的药学上可接受的

前药、溶剂化物或盐的药物组合物同时给药或不同时给药。其它药物可以构成相同组合物的一部分,或以单独的组合物的形式提供所述其它药物,以用于将其同时给药或不同时给药。

[0213] 本发明组合物可以与本领域已知的其它化疗剂联合给药,例如:

[0214] - 抗代谢剂,例如叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂,包括但不限于,阿糖胞苷 (cytarabine) (CYTOSAR-U)、阿糖胞苷 (cytosine arabinoside)、氟尿嘧啶 (5-FU)、氟尿嘧啶脱氧核苷 (FudR)、6- 硫鸟嘌呤、6- 巯基嘌呤 (6-MP)、喷司他丁、甲氨蝶呤、10- 炔丙基 -5,8- 双去氮叶酸酯 (PDDF, CB3717)、5,8- 双去氮四氢叶酸 (DDATHF)、亚叶酸、磷酸氟达拉滨、喷司他丁和吉西他滨。

[0215] - 合适的天然产物及其衍生物, (例如,长春花生物碱、抗肿瘤抗生素、酶、淋巴因子和表鬼臼毒素),包括但不限于, Ara-C、紫杉醇 (泰素 (k)、多西紫杉醇 (泰索帝)、脱氧助间型霉素、丝裂霉素 -C, L- 天门冬氨酸酰胺酶、咪唑嘌呤;布喹那;生物碱,例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛等;鬼臼毒素,例如依托泊苷、替尼泊苷等;抗生素,例如蒽环类抗生素、盐酸柔红霉素 (柔红霉素 (daunomycin)、柔红霉素 (rubidomycin)、柔红霉素 (cerubidine))、伊达比星、多柔比星、表柔比星和吗啉代衍生物等;吩噻嗪酮双环肽,例如更生霉素;碱性糖肽,例如博来霉素;蒽醌苷,例如光辉霉素 (plicamycin) (光辉霉素 (mithramycin));蒽二酮,例如米托蒽醌;吡咯并吡啶二酮 (azirinopyrrolo indoledione),例如丝裂霉素;大环免疫抑制剂,例如环孢霉素、FK-506 (他克莫司,普乐可复)、雷帕霉素等。其它抗增殖细胞毒性剂为诺维本、CPT-11、阿那曲唑、来曲唑、卡培他滨、雷洛昔芬、环磷酰胺、异磷酰胺和屈洛昔芬。

[0216] - 具有抗增殖活性的微管干扰剂也适合使用,并且包括但不限于, 别秋水仙碱 (allocolchicine) (NSC 406042)、软海绵素 B (NSC 609395)、秋水仙碱 (NSC 757)、秋水仙碱衍生物 (例如, NSC 33410)、多拉司他汀 10 (NSC 376128)、美登素 (NSC 153858)、根霉素 (NSC 332598)、紫杉醇 (泰素)、T-ol 衍生物、多西紫杉醇 (泰索帝)、硫代秋水仙碱 (NSC 361792)、三苄基半胱氨酸、硫酸长春碱、硫酸长春新碱、天然和合成埃博霉素,所述埃博霉素包括但不限于,埃博霉素 A、埃博霉素 B、盘皮海绵内酯 (discodermolide);雌莫司汀、诺考达唑等。

[0217] - 酪氨酸激酶抑制剂,例如吉非替尼、伊马替尼、索拉非尼、达沙替尼和埃罗替尼。

[0218] - 拓扑异构酶 II 抑制剂,包括但不限于,表鬼臼毒素,例如托泊替康、伊立替康、依托泊苷和替尼泊苷。

[0219] - 蒽环类抗生素 (例如柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌)。

[0220] - 单克隆抗体,例如西妥昔单抗、贝伐珠单抗、利妥昔单抗、阿仑单抗和曲妥珠单抗。

[0221] 此外,对于本发明第一和第三组合物而言,组合物可另外包含烷化剂。适于在本发明第一和第三组合物中使用的烷化剂包括基于铂的化合物,例如碳铂、顺铂、奈达铂、奥沙利铂、四硝酸三铂、沙铂及以上的组合;烷基磺酸盐,例如白消安、乙撑亚胺和甲基密胺,例如六甲基密胺 (hexamethylmelamine)、六甲密胺 (altretamine) 或塞替派、氮芥 (nitrogenmustard),例如环磷酰胺、双氯乙基甲胺或氮芥、乌拉莫司汀或尿嘧啶氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥或异磷酰胺,亚硝基脲,例如卡莫司汀或链脲菌素、三氮烯例如达卡巴嗪和

咪唑四嗪,例如替莫唑胺。

[0222] 此外,对于本发明第一和第二组合物而言,组合物还可以包含死亡受体配体。优选地,所述死亡受体配体选自 NGF、CD40L、CD137L/4-1BBL、TNF- α CD134L/OX40L、CD27L/CD70、FasL/CD95、CD30L、TNF- β /LT- α 、LT- β 和 TRAIL。在优选实施方案中,TNF 家族成员是 TRAIL、TRAIL 的功能等同衍生物或 TRAIL 的小模拟化合物。TRAIL (TNF 相关凋亡诱导配体) 还称为“Apo-2 配体”、“Apo-2L”、“Apo2L”、“Apo2L/TRAIL”和“Apo-2 配体 /TRAIL”,其是能够在表达 TRAIL 同族受体的细胞中诱导凋亡的分子。数年前,TRAIL 被鉴定为细胞因子的 TNF 家族的成员 (Pitti et al., 1996, J. Biol. Chem., 271 :12687-12690 和美国专利第 6, 284, 236 号)。全长天然序列人源 TRAIL 多肽长度为 281 个氨基酸,是 II 型跨膜蛋白。可溶形式的 TRAIL 的晶体学研究表现出与 TNF 和其他相关蛋白的结构相似的同三聚体结构。但是,与其它 TNF 家族成员不同,发现 TRAIL 具有特有的结构特征,该特征为 3 个半胱氨酸残基(位于同三聚体中每个亚基的位置 230) 共同与锌原子配位,并且锌结合对于三聚体稳定性和生物活性是重要的。本发明考虑到使用 3 种不同 TRAIL 异形体 (TRAIL α 、TRAIL β 和 TRAIL γ) 中的任意一种或其组合。

[0223] 功能等同 TRAIL 变体包括:诸如 W008088582 和 US6284236 中所述的可溶性 TRAIL 异形体或 US2002128438 中所述的 TRAIL 片段 95-281, 114-281; Bremer et al (Neoplasia, 2004, 6 :636-45) 所述的 scFv :sTRAIL 融合; US2002061525 中所述的备选剪接形式的 TRAIL; W004101608 中所述的 TRAIL- 受体结合肽; 具有对于促凋亡受体的增加的特异性的 TRAIL 变体,例如 W007063301 中所述的 19IL、199V、201R、213W、215D 和 / 或 193S TRAIL 突变体或如 W004001009A 中所述的通过对于受体的噬菌体展示选择的变体; 针对 TRAIL- 同族受体 TRAIL-R1 (DR4) 和 TRAIL-R2 (DR5) 的拮抗抗体,例如马帕木单抗、来沙木单抗、W007128231 中所述的抗体或 W002094880 中所述的抗体、W006017961 中所述的单克隆抗体 AD5-10、W005056605 中所述的 TRAIL- 特异性串联双链抗体和三链抗体、W09937684 中所述的嵌合抗 DR4 抗体、W003038043 中所述的拮抗性抗 DR5 抗体、W002085946 中所述的双特异性抗 TRAIL 受体抗体、W09832856 中所述的抗 DR4 特异性抗体、Park, K. J et al (Cancer Res., 2007, 67 :7327-7334) 所述的抗 -DR2ScFV; W008025516 和 W004014951 中所述的三聚体 TRAIL 融合蛋白; W007102690 中所述的十二聚体 TRAIL 变体; W007145457 中所述的聚乙二醇化的 TRAIL; 包含编码 TRAIL 的多核苷酸的 DNA 载体,例如 US2006153809、W004087930、US2005031593 中所述的那些载体。

[0224] 具有促凋亡作用的小分子 TRAIL 模拟物包括 W02008094319 中所述的化合物。

[0225] 本发明组合物的治疗用途

[0226] 鉴于本发明组合物在抑制肿瘤细胞生长中的协同效应,可以将它们用于医药。因此,在另一方面,本发明涉及本发明组合物在医药中的用途。

[0227] 另一方面,本发明涉及治疗癌症的方法,所述方法包括给予患者包含以下的组合物:(i) 酸性神经酰胺酶抑制剂和胆碱激酶抑制剂,(ii) 胆碱激酶抑制剂和化疗剂或 (iii) 胆碱激酶抑制剂和死亡受体配体。可选地,本发明涉及包含 (i) 酸性神经酰胺酶抑制剂和胆碱激酶抑制剂,(ii) 胆碱激酶抑制剂和化疗剂或 (iii) 胆碱激酶抑制剂和死亡受体配体的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。可选地,本发明涉及用于治疗癌症的组合物,其包含 (i) 酸性神经酰胺酶抑制剂和胆碱激酶抑制剂,(ii) 胆碱激酶抑制剂和化疗剂

或 (iii) 胆碱激酶抑制剂和死亡受体配体。

[0228] 本发明还考虑到给予任何本发明的药物组合物,所述药物组合物包括如上文所述的其它抗肿瘤剂。优选地,所述癌症选自:重链病、白血病(例如,急性髓细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性粒-单核细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、幼年粒-单核细胞性白血病等)、转移灶、赘生物、肿瘤(例如,听神经瘤、腺癌、肾上腺皮质癌、肛门癌、血管肉瘤、星形细胞瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、支气管癌、腹膜癌、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、绒毛膜癌、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、囊腺癌、胚胎性癌、子宫内膜癌、内皮肉瘤、室管膜细胞瘤、上皮癌、食道癌、尤文氏瘤、纤维肉瘤、胃肠癌、生殖泌尿道癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、头癌、成血管细胞瘤、肝细胞瘤、霍奇金病、肾癌、平滑肌肉瘤、脂肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴管内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴瘤、恶性高钙血症、恶性胰腺胰岛瘤、髓样癌、髓母细胞瘤、黑色素瘤、脑脊膜瘤、间皮瘤、颈癌、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、少突神经胶质瘤、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状腺癌、乳头状癌、阴茎癌、松果体瘤、恶性前皮肤病变、原发性脑瘤、原发性巨球蛋白血症、原发性血小板增多症、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、皮脂腺癌、精原细胞瘤、小细胞肺癌、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜瘤、汗腺癌、睾丸瘤、甲状腺癌、子宫癌、外阴癌和维尔姆斯氏瘤),或特征为不受控制的细胞生长的任何疾病或病症。

[0229] 在优选实施方案中,所述癌症是肺癌。如本文所用的“肺癌”涉及侵袭肺组织中存在的一种或多种细胞的任何瘤性变化。可以使用本发明组合物进行治疗的示例性的非限制性的肺癌类型包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌、包括鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌和间皮瘤。在更优选的实施方案中,所述肺癌是非小细胞肺癌。

[0230] 在另一优选实施方案中,所述癌症是结肠癌或结肠直肠癌。如本文所用的术语“结肠直肠癌”包括任何类型的结肠、直肠和阑尾肿瘤,并且指早期和晚期腺瘤和癌症以及遗传性、家族性或散发性癌症。遗传性 CRC 包括涉及存在息肉的那些综合征,例如错构息肉病综合征和最熟知的家族性腺瘤性息肉病 (FAP),遗传性 CRC 还包括非息肉病综合征,例如遗传性非息肉病结肠直肠癌 (HNPCC) 或 Lynch 综合征 I。本发明允许在结肠直肠癌的不同阶段对其进行诊断,例如,按照 Dukes 分类的 A 期、B 期、C1 期、C2 期和 D 期,按照 Astler-Coller 分类的 A 期、B1 期、B2 期、B3 期、C1 期、C2 期、C3 期和 D 期,按照 TNM 系统的 TX 期、T0 期、Tis 期、T1 期、T2 期、T3 期、NX 期、N0 期、N1 期、N2 期、MX 期、M0 期和 M1 期,以及按照 AJCC(美国癌症联合委员会)分类的 0 期、I 期、II 期、III 期和 IV 期。

[0231] 可以将本发明的组合物配制为单一制剂,或可选地,可以将本发明的组合物提供为用于同时给药、合并给药、分别给药或相继给药的产品。

[0232] 利用酸性神经酰胺酶抑制剂、化疗剂或死亡受体配体使肿瘤细胞对 ChoK 抑制剂的
治疗敏感化

[0233] 本发明的发明人还观察到:当事先或同时用酸性神经酰胺酶抑制剂(参见本发明实施例 6)、化疗剂(参见实施例 7 和 9)或死亡受体配体(参见实施例 8)处理细胞时,对胆碱激酶抑制剂的反应被增强。

[0234] 因此,在另一方面,本发明涉及增加肿瘤细胞对胆碱激酶抑制剂的敏感性的方法,包括用酸性神经酰胺酶抑制剂、化疗剂或死亡受体配体处理所述肿瘤细胞。在仍然另一方面,本发明涉及使用酸性神经酰胺酶抑制剂、化疗剂或死亡受体配体来增加肿瘤细胞对

胆碱酯酶抑制剂的敏感性。

[0235] 本文所用的术语“敏感性”是指细胞对于给定胆碱酯酶抑制剂的反应，并且通常按照造成肿瘤细胞生长的 50% 抑制的胆碱酯酶抑制剂的最小剂量来确定“敏感性”。因此，酸性神经酰胺酶抑制剂、化疗剂或死亡受体配体增加敏感性或降低实现 50% 生长抑制所需的最小剂量来发挥作用。

[0236] 可以通过在给予 ChoK 抑制剂的同时、之后或之前用酸性神经酰胺酶抑制剂、化疗剂或死亡受体配体处理细胞来实现肿瘤细胞对 ChoK 抑制剂治疗的敏感化作用。可以用于增加肿瘤细胞对 ChoK 抑制剂的敏感性的酸性神经酰胺酶抑制剂、化疗剂和死亡受体配体可以是上文所述构成本发明组合物一部分的任何化合物。此外，可以用于处理被用酸性神经酰胺酶抑制剂或死亡受体配体敏感化的细胞的 ChoK 抑制剂基本上是上文所述作为本发明组合物的组分的任何抑制剂。

[0237] 鉴定表现出对 ChoK 抑制剂的抗性的癌症患者的方法

[0238] 此外，本发明发明人的发现提供了通过测定患者的样品中酸性神经酰胺酶水平来鉴定可能表现出对 ChoK 抑制剂治疗的抗性的癌症患者的可能性。如果酸性神经酰胺酶水平相对于参考样品升高，则表明该患者可能表现出对 ChoK 抑制剂的抗性，因为响应于 ChoK 抑制而产生的促凋亡神经酰胺酶会被水解，产生具有促有丝分裂作用的鞘氨醇。相反，如果酸性神经酰胺酶水平相对于参考样品的水平降低或至少未升高，则表明该患者会有效响应于 ChoK 抑制剂治疗。

[0239] 因此，在另一方面，本发明涉及鉴定对 ChoK 抑制剂治疗具有抗性的癌症患者的方法（下文中本发明第一方法），包括测定来自所述患者的样品中酸性神经酰胺酶的水平，其中当所述样品中酸性神经酰胺酶水平高于参考样品时，该患者被鉴定为对 ChoK 抑制剂具有抗性。

[0240] 为了实施本发明第一方法，从研究中的个体获得样品。本文所用的术语“样品”涉及可以从患者获得的任何样品。本方法可以应用于来自患者的任何类型的生物样品，例如活组织检查样品、组织、细胞或液体（血清、唾液、精液、痰、脑脊液（CSF）、眼泪、粘液、汗、乳、大脑提取物等）。在具体实施方案中，所述样品是组织样品或其部分，优选为肿瘤组织样品或其部分。可以通过常规方法获得所述样品，例如利用相关医学领域技术人员公知的方法所进行的活组织检查。从活组织检查获取样品的方法包括团块粗分或显微切割或其它本领域已知的细胞分离方法。肿瘤细胞还可以获自细针抽吸细胞学。为了简化样品的保存和处理，可以将这些样品进行福尔马林固定和石蜡包埋，或通过这些样品浸入允许快速冷冻的非常低温的介质中首先冷冻，然后包埋在诸如 OCT- 化合物的可低温凝固的介质中。

[0241] 如果可以获得来自患者的样品，本发明第一方法包括测定酸性神经酰胺酶的水平。本领域技术人员应当理解，可以通过以下测定“酸性神经酰胺酶的水平”：测定编码酸性神经酰胺酶的 mRNA 水平、测定酸性神经酰胺酶的水平或测定酸性神经酰胺酶的酶活性。

[0242] 如果通过测定酸性神经酰胺酶的 mRNA 表达水平来确定“表达水平”，可以通过物理上或机械上的方式处理生物样品来破坏组织或细胞结构，从而将细胞内组分释放到水性溶液或有机溶液中以制备用于后续分析的核酸。利用本领域技术人员已知的方法和可商购的产品从样品中提取核酸。然后，通过本领域的任何常规方法从冷冻或新鲜样品中提取 RNA，例如，Sambrook, J., et al., 2001. Molecular cloning : a Laboratory Manual (分子

克隆:实验手册),第三版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., Vol. 1-3。优选地,在提取过程中注意避免 RNA 降解。

[0243] 在具体实施方案中,使用获自福尔马林固定的、石蜡包埋的组织样品的 mRNA 来测定表达水平。可以从首先脱石蜡的存档病理学样品或活组织检查样品中分离 mRNA。示例性的脱石蜡方法包括用诸如二甲苯的有机溶剂洗涤石蜡化的样品。可以用低级醇的水性溶液使脱石蜡的样品再水化。合适的低级醇包括,例如甲醇、乙醇、丙醇和丁醇。例如,可以利用逐渐降低浓度的低级醇溶液的连续洗涤使脱石蜡的样品再水化。可选地,将样品同时脱石蜡和再水化。然后,裂解样品并从样品中提取 RNA。

[0244] 尽管所有基因表达分析技术(RT-PCR、SAGE 或 TaqMan)都适用于实施本发明的以上方面,但是通常通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)测定基因 mRNA 表达水平。在具体实施方案中,通过定量 PCR 测定酸性神经酰胺酶 mRNA 的表达水平,优选通过实时 PCR。可以在个体样品或组织微阵列中进行检测。

[0245] 为了将不同样品中 mRNA 表达的值标准化,可以将测试样品中目的 mRNA 的表达水平与对照 RNA 的表达进行比较。本文所用的“对照 RNA”涉及这样的 RNA,其在肿瘤细胞中的表达水平相对于其在非肿瘤发生细胞中的表达水平没有改变或仅改变有限量。优选地,对照 RNA 是对应于管家基因的 mRNA,所述管家基因为 mRNA 编码组成型地表达并实行细胞功能的蛋白。用于本发明的优选的管家基因包括 β -2-微球蛋白、泛素,18-S 核糖体蛋白、亲环蛋白、GAPDH 和肌动蛋白。在优选实施方案中,对照 RNA 是 β -肌动蛋白 mRNA。在一个实施方案中,按照比较 Ct 法、使用 β -肌动蛋白作为内部对照并使用商购 RNA 对照作为校准物来计算相对基因表达定量。按照公式 $2^{-(\Delta Ct \text{ 样品} - \Delta Ct \text{ 校准物})}$ 确定最终结果,其中通过从管家基因的值减去靶基因的 CT 值确定校准物和样品的 ΔCt 值。

[0246] 一旦测定了酸性神经酰胺酶 mRNA 的 mRNA 表达水平,本发明第一方法包括将该表达水平与参考样品中的表达水平进行比较。本文所用的“参考样品”应理解为具有酸性神经酰胺酶 mRNA 的参考水平的样品。例如,参考样品可以是获自与所研究的肿瘤患者相似但是对 ChoK 抑制剂没有抗性的患者的肿瘤样品。可选地,参考样品可以是来源于数位患有所研究的相同类型肿瘤的患者肿瘤组织样品混合物。可选地,还可以测定肿瘤样品集合的 mRNA 表达水平,并确定所有个体值的中间值。然后,将得到的中间值作为参考来确定在所研究的样品中获得的 mRNA 表达值是否应当视为增加。

[0247] 由于个体间存在差异(例如年龄、种族等相关方面),所以建立 mRNA 水平的绝对参考值是非常难的(如果不是实际上无法实现的话)。因此,在具体实施方案中,通过利用常规方法计算百分比值来确定用于“升高的”或“降低的”酸性神经酰胺酶 mRNA 水平的参考值,所述常规方法包括测试从正常个体(即未诊断为 NSCLC 的人)分离的一组样品的酸性神经酰胺酶 mRNA 的表达水平。优选地,“升高的”水平可以被指定为酸性神经酰胺酶 mRNA 的表达水平等于或超出 50% 正常群体的样品,例如,包括表达水平等于或超出 60% 正常群体、等于或超出 70% 正常群体、等于或超出 80% 正常群体、等于或超出 90% 正常群体以及等于或超出 95% 正常群体。

[0248] 可选地,在另一具体实施方案中,可以通过测定酸性神经酰胺酶的蛋白水平来确定酸性神经酰胺酶的水平。可以通过诸如 ELISA、Western 印迹或免疫荧光的免疫学技术进行蛋白表达水平的测定。Western 印迹是基于以下来检测蛋白的:先通过变性条件下的

凝胶电泳进行分离,固定在膜上,通常是硝酸纤维素膜,与特异性抗体孵育,以及显影系统(例如化学发光)。通过免疫荧光的分析需要使用用于表达分析的靶蛋白的特异性抗体。ELISA 是基于使用抗原或用酶标记的抗体,使得靶抗原和标记的抗体之间形成的结合物导致形成具有酶学活性的复合物。因为组分之一(抗原或标记的抗体)是固定在支持物上的,所以抗体-抗原复合物被固定在该支持物上,并因此可以通过添加底物来检测该抗体-抗原复合物,所述底物被酶转化为可通过例如分光光度计或荧光计检测的产物。

[0249] 可选地,可以通过构建包含装配的患者样品的组织微阵列(TMA)并通过免疫组织化学技术测定蛋白的表达水平来进行酸性神经酰胺酶蛋白表达水平的测定。免疫染色强度可以由两名不同的病理学专业人员进行评估,并且为了保持方法的可重复性,可以使用一致且明确的界限标准进行评分。通过同时再评估可以解决差异。简言之,考虑到肿瘤细胞中的表达和对于每种标志物的具体界限,免疫染色结果可以记录为阴性表达(0)与阳性表达,以及低表达(1+)、中度表达(2+)和高表达(3+)。作为通用标准,选择界限是为了便于可重复性并且在可能的情况下转换生物事件。

[0250] 当使用免疫学方法时,可以将已知能以高亲和力结合靶蛋白的任何抗体或试剂用于检测靶蛋白的量。尽管如此,优选使用抗体,例如多克隆血清、杂交瘤上清或单克隆抗体、抗体片段、Fv、Fab、Fab' y F(ab')₂、ScFv、双链抗体、三链抗体、四链抗体和人源化抗体。

[0251] 无论酸性神经酰胺酶水平是通过测定 mRNA 表达水平还是通过测定蛋白水平而确定的,所获得的值需要与参考样品的值进行比较。参考样品可以对应于通过将来自多名健康患者的相同量混合而得到的样品。一旦建立该参考样品值,来自患者的肿瘤组织中该标志物的表达水平可以与该中间值进行比较,并从而被指定为“低”水平、“正常”水平或“高”水平。参考水平来源的样品的集合优选地由与患者年龄相同的健康人组成。在任何情况下,其可以含有不同数目的样品。在更优选的实施方案中,样品是脑活组织检查样品。优选地,所述集合应当足以提供准确的参考水平。优选地,用于产生参考值的样品数多于10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、500个样品。

[0252] 在具体实施方案中,与参考值相比,高于参考值的至少1.1倍、1.5倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或甚至更多倍的表达增加被认为是“高”表达。在具体实施方案中,与参考值相比,低于参考值的至少0.9倍、0.75倍、0.2倍、0.1倍、0.05倍、0.025倍、0.02倍、0.01倍、0.005倍或更低的表达降低被认为是“低”表达。

[0253] 另一方面,可以通过构建包含装配的个体样品的组织微阵列(TMA)并通过本领域公知的免疫组织化学技术测定蛋白的表达水平来进行蛋白表达水平的测定。

[0254] 在另一实施方案中,通过测定所研究的样品中酸性神经酰胺酶的活性进行酸性神经酰胺酶水平的测定。测定酸性神经酰胺酶的酶活性的方法是本领域技术人员公知的并在上文已有详细描述。

[0255] 为癌症患者选择个体化治疗的方法

[0256] 本发明的发明人所提供的结果允许基于来自患者的样品中酸性神经酰胺酶的表达水平来鉴定将要表现出对ChoK抑制剂治疗的抗性的那些癌症患者。因此,在另一方面,本发明涉及为癌症患者选择个体化治疗的方法(下文中本发明第二方法),包括测定来自所述患者的样品中酸性神经酰胺酶的水平,其中如果所述样品中酸性神经酰胺酶的表达水

平高于参考样品,则患者适于用 ChoK 抑制剂或 ChoK 抑制剂和酸性神经酰胺酶抑制剂的组合进行治疗。

[0257] 本发明第二方法的步骤与本发明第一方法所述基本相同,并且包括测定来自患者的样品(优选为肿瘤样品)中酸性神经酰胺酶的水平,其中可以使用上述任何方法通过测定 mRNA 水平、蛋白水平或酸性神经酰胺酶活性来测定所述水平。

[0258] 一旦测定了酸性神经酰胺酶水平并且与参考样品进行了比较,高于参考样品的酸性神经酰胺酶水平指示该患者适于用 ChoK 抑制剂和酸性神经酰胺酶抑制剂的组合进行治疗。

[0259] 在优选实施方案中,所述癌症是非小细胞肺癌。

[0260] 鉴定增加 ChoK 抑制剂的治疗效果的化合物的方法

[0261] 本发明的发明人已经发现:表现出对 ChoK 抑制剂增加的抗性的肿瘤细胞具有升高的酸性神经酰胺酶水平。因此,通过测定响应于给定化合物的酸性神经酰胺酶增加的水平,就可以确定该化合物是否能够降低对 ChoK 抑制剂的抗性,即增加这些化合物的治疗效果。

[0262] 因此,在另一方面,本发明涉及鉴定能够增加 ChoK 抑制剂在治疗癌症中的治疗效果的化合物的方法(下文中本发明第三方法),包括以下步骤:

[0263] (i) 使表现出对 ChoK 抑制剂的抗性的肿瘤细胞与候选化合物接触;以及

[0264] (ii) 测定所述细胞中酸性神经酰胺酶的水平;

[0265] 其中如果用候选化合物处理后的细胞中酸性神经酰胺酶的水平低于处理前,则所述候选化合物被认为能够增加 ChoK 抑制剂在治疗癌症中的效果。

[0266] 本发明第三方法包括的第一步骤包括使表现出对 ChoK 抑制剂的抗性的肿瘤细胞与候选化合物接触。应当理解,可以在非人的动物体内进行所述接触步骤,或可以在表现出对 ChoK 抑制剂的抗性的细胞培养物上体外进行所述接触步骤,所述非人动物含有由对 ChoK 抑制剂具有抗性的细胞形成的肿瘤。

[0267] 当在体外实施本发明第三方法时,需要对 ChoK 抑制剂具有抗性的肿瘤细胞的细胞培养物。可以从之前基于对 ChoK 抑制剂的抗性进行选择的肿瘤细胞、之前进行过一轮或多轮逐渐增加浓度的 ChoK 抑制剂的选择的肿瘤细胞、过表达 ChoK 的细胞或组成性表达 ChoK 的特异性 siRNA 的细胞获得培养物。如果通过一轮或多轮逐渐增加浓度的 ChoK 抑制剂的选择来选择细胞,前面段落中提及的任何 ChoK 抑制剂可适用于该目的。

[0268] 一旦建立对 ChoK 抑制剂具有抗性的细胞培养,使该培养物与将要测定对增加 ChoK 抑制剂治疗效果的作用的候选化合物接触。根据本发明,使细胞与候选化合物“接触”包括使候选化合物进入表达 DNA 构建体的细胞的任何可能方式。因此,如果候选化合物是低分子量的分子,将所述分子添加至培养基就足够了。如果候选化合物是高分子量的分子(例如,诸如核酸或蛋白的生物聚合物),必须提供能够使该分子进入细胞内部的方法。如果候选分子是核酸,可以使用任何本领域已知的方法(磷酸钙、DEAE-葡聚糖、凝聚胺、电穿孔、显微注射、脂质体介导的融合、脂转染、逆转录病毒感染和基因枪转染)应用常规转染手段。如果候选化合物是蛋白,可以使细胞与蛋白直接接触或与编码其的核酸接触,所述核酸与允许它在处于细胞内部时进行转录/翻译的元件相连。可选地,可以使细胞与所研究的蛋白的变体接触,所述蛋白已用可以促进该蛋白转移入细胞内部的肽进行修饰,所述肽

例如来源于 HIV-1 TAT 蛋白的 Tat 肽、来自黑腹果蝇 (*D. melanogaster*) 的触角足同源域蛋白的第三螺旋、单纯疱疹病毒的 VP22 蛋白和精氨酸寡聚物 (Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci, 21 :99-103, Schwarze, S. R. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21 :45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol. Therapy 8 :143-150 和 Snyder, E. L. and Dowdy, S. F., 2004, Pharm. Res. 21 :389-393)。

[0269] 优选地,待测试的化合物不是分离的,而是构成来源于天然来源的有一定复杂程度的混合物的一部分或构成化合物文库的一部分。可以按照本发明方法进行检测的化合物文库的实例包括但不限于,肽文库,包括肽和肽类似物的文库,所述肽类似物包括 D- 氨基酸或包含非肽键的肽;核酸文库,包括具有硫代磷酸酯型非磷酸二酯键的核酸或肽核酸的文库;抗体文库;碳水化合物文库;低分子量化合物文库,优选为有机分子;肽模拟物文库等。如果使用低分子量有机化合物文库,可以预先选择文库,使得其包括可以容易进入细胞内部的化合物。因此可以基于某些参数选择化合物,例如大小、亲油性、亲水性、形成氢键的能力。

[0270] 或者,待检测的化合物可以构成获自天然来源的提取物的一部分。所述天然来源可以是来自任何环境的动物、植物来源,包括但不限于土壤、空气、海洋生物等的提取物。

[0271] 在第二步骤中,本发明方法包括测定用候选化合物处理的细胞的酸性神经酰胺酶水平。可以按照上文所述,通过使用上文所述的任何生物化学方法测定细胞提取物中的 mRNA 水平、蛋白水平或酸性神经酰胺酶活性以进行酸性神经酰胺酶水平的测定。导致酸性神经酰胺酶水平降低的那些化合物将被选择为用于增加肿瘤细胞对 ChoK 抑制剂的反应的候选化合物。

[0272] 如果候选化合物构成有一定复杂程度的混合物的一部分,本发明还包括将所述混合物进行分级的一个或数个步骤 (iii),和将本发明方法的步骤 (i)、(ii) 和 (iii) 重复可变次数直至分离出混合物中负责转录促进活性的化合物。将存在于混合物中的化合物进行分级的方法包括层析法(薄层层析、气相色谱、凝胶分子排除层析、亲和层析)、结晶化、蒸馏、过滤、沉淀、升华、萃取、蒸发、离心、质谱、吸附等。

[0273] 在另一实施方案中,在癌症动物模型中体内进行本发明的筛选方法,通过植入表现出对 ChoK 抑制剂的抗性的非人动物肿瘤细胞来获得所述癌症动物模型。可以使用任何上文所述的方法获得细胞。对 ChoK 抑制剂具有抗性的细胞可以被植入任何物种的任何非人动物,优选为哺乳动物,并且更优选为灵长类动物(猴、狒狒、黑猩猩等)、啮齿动物(小鼠、大鼠、兔、几内亚猪、仓鼠等)或猪。为了便于肿瘤细胞的植入,动物可以是免疫缺陷的动物。可以被植入接受体生物的肿瘤细胞包括循环肿瘤细胞、肿瘤干细胞、来源于永生化循环肿瘤细胞的细胞系、微转移肿瘤细胞、来源于永生化微转移肿瘤细胞的细胞系、来源于永生化的已被从实体瘤中纯化的肿瘤细胞的细胞系、来自实体瘤的原代肿瘤细胞、从实体瘤中切除的新鲜肿瘤碎片、原代肿瘤细胞、来源于已被从临床转移中纯化的永生化的细胞的细胞系(即 PC3 细胞系)和以上的任意组合。

[0274] 一旦获得携带由对 ChoK 抑制剂具有抗性的细胞形成的肿瘤的动物模型,本方法的第一步骤包括使所述肿瘤细胞与候选化合物接触。通过在适于化合物接近肿瘤细胞的条件下向动物给予候选化合物进行所述接触步骤。可以通过任何合适的途径给予测试化合物,包括,例如口服给药、经皮给药、静脉内给药、输注给药、肌肉内给药等。

[0275] 一旦肿瘤与候选化合物接触,按照上文所述测定所述肿瘤细胞中酸性神经酰胺酶的表达水平,即通过测定酸性神经酰胺酶 mRNA 水平、酸性神经酰胺酶蛋白水平或酸性神经酰胺酶活性。

[0276] 本发明第三方法包括将用候选化合物处理后肿瘤细胞中酸性神经酰胺酶的水平与治疗前所观察到的水平进行比较。在本文中,当酸性神经酰胺酶表现出至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 100% (即无法检测到酸性神经酰胺酶水平) 的降低时,认为酸性神经酰胺酶降低了。即,酸性神经酰胺酶的水平是可检测的。

[0277] 现在通过以下方法和实施例详细描述本发明,这些方法和实施例应当视为仅是举例说明,而不是限制本发明的范围。

实施例

[0278] 材料和方法

[0279] 患者

[0280] 将来自 84 名随机选择的患者的肺癌组织样本用于分析,这些患者在 2001-2004 年间进行过 NSCLC 的手术切除并且由位于马德里 La Paz 医院的医学肿瘤部门 (The Medical Oncology division) 进行随访。未给予这些患者辅助治疗。该研究由医院的伦理审查委员会批准,并且从所有患者获得了书面形式的知情同意书。

[0281] NSCLC 肿瘤的原代培养物

[0282] 将从 NSCLC 患者切除的组织进行解离 (细胞解离组织筛破碎试剂盒 CD1, SIGMA), 并且将获得的细胞接种于 24 孔板中 (BD, Falcon, Bioscience, San Jose, CA, USA)。用渐增浓度 (0、0.5、1、5、10 和 20 μ M) 的 cDDP、泰素、长春瑞滨、吉西他滨和 MN58b 处理细胞 10 天,所述细胞培养于补充了 10% 胎牛血清 (FBS, Life Technologies, Grand Island, NY) 的 DMEN:F12HAM (Ref :D8437, SIGMA) 中。按照之前所述的结晶紫法 (Rodríguez-González, A. et al., Oncogene, 22 :8803-8812) 将每孔中最终不变的群体进行定量。

[0283] 化合物

[0284] MN58b 已在 W09805644 中进行过描述,并且对应于 1,4-(4-4'-双-((4-(二甲基胺)吡啶鎓-1-基)甲基)二苯基)二溴丁烷。RSM-932A 已在美国专利申请 US2007185170 中进行过描述,并且对应于 1,1'(二苯基-4,4'-二基亚甲基)双[4-(4-氯-N-甲基苯胺基-)喹啉鎓]二溴化物。NOE 已由 Sugita et al (Biochim. Biophys. Acta, 1975, 398 :125-131) 进行过描述,并且对应于 N-油酰乙醇胺 (NOE)。D-NMAPPD 对应于 3-乙氧基-1-(2-甲基氨基乙基)-3-苯基-吡啶-2-酮 (CAS 35922-06-6),并且已经由 Raisova, M., et al. (FEBS Lett., 2002, 516 :47-52) 和 Selzner, M. et al. (Cancer Res., 2001, 61 :1233-1240) 进行过描述。TRAIL 之前已有描述,并且对应于人源 TRAIL 的细胞外结构域 (氨基酸 95-281)。

[0285] RNA 分离和基因表达分析

[0286] 使用 RNeasy 迷你试剂盒 (QIAGEN, Hilden, Germany) 按照厂商的使用说明,从选择的活组织检查样品分离 RNA 用于微阵列和 QT-PCR。按照 Affymetrix 基因芯片表达分析技术手册进行样品制备和阵列杂交。在国家生物技术中心 (National Center of

Biotechnology)(马德里,西班牙)的基因组学楼(Genomic Facility)中,按照 www.affymetrix.com(Affymetrix, Santa Clara, CA)所述进行与 Affymetrix U133plus2 基因芯片(54,614 探针设置,代表 47,000 个转录物)的杂交、染色、洗涤和扫描步骤。信号对数比值估计转录物变化的幅度和方向。使用以 2 为底的对数,因此 1.0 的信号对数比值表示转录物水平增加 2 倍,-1.0 表示降低 2 倍。0 的信号对数比值表示无变化。

[0287] 通过使用 Ingenuity 通路软件(IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com)按照生物进程将基因分类。将在抵抗和敏感之间差异性调节的基因覆盖在从 Ingenuity 通路知识库中所含信息发展而来的全局分子网络上。然后,基于连接性,运算生成差异性表达基因的网络,最终产生的网络是基因间分子关系的图形表示。出版的参考文献、书籍或权威信息储存在 Ingenuity 通路知识库(Sorensen G, BMC Genomics, 2008, 9:114; Kim SY et al., Stat. Methods Med. Res., 2006, 15:3-20),其支持所有描述的连接。

[0288] 微阵列分析的实时定量 PCR 验证

[0289] 使用大容量 cDNA 库试剂盒(Applied Biosystems)将 1 μ g RNA 用于产生 cDNA,使用 ABI PRISM 7700 序列检测仪(Applied Biosystems)一式三份进行实时定量 PCR。GAPDH 和 18S 核糖体 mRNA 作为内部对照扩增。扩增用探针来自 Applied Biosystems 的 Taqman 基因表达检测(ASAH1:HS00602774_M1 Taqman 探针, ASAH2:HS00184096_M1 Taqman 探针和 ASAH3:HS00370322_M1 Taqman 探针, DUT:HS00798995_S1 Taqman 探针, TYMS:HS00426591_M1 Taqman 探针, UPP1:HS00427695_M1 Taqman 探针, RRM2:HS00357247_G1 Taqman 探针)。 $2^{-\Delta \Delta C_t}$ 法(Livak KJ., Methods. 2001;25:402-8)被用于计算每个基因的相对表达。

[0290] 细胞培养和对 ChoK 抑制剂具有抗性的细胞系的产生

[0291] 本研究中使用的所有细胞系都保持在温度(37℃)、湿度(95%)和 CO₂(5%)的标准条件下。人原代支气管上皮细胞 NHBE(BEC)(Cambrex, CC-2541)生长在 BEGM(支气管上皮细胞生长培养基)BulletKit(Cambrex, CC-3170)中。人原代乳腺上皮细胞 HMEC(Clonetics, CC-2551)生长在补充了 bullet kit(Clonetics, CC-3150)的 MEM 培养基中。非小肺癌上皮细胞 H460 与 H1299 和小细胞肺癌上皮细胞系 H510 与 H82 保持在补充了 10%胎牛血清(FBS)(Life Technologies, Grand Island, NY)的 RPMI 中。

[0292] 通过长时间持续暴露于渐增浓度的每种药物产生对 MN58b 和 RSM-932A 具有抗性的细胞系(分别鉴定为 MN58R 和 RSM-932A-R)。不存在化合物的细胞系平行对照(H460 储备)也同时保持培养。

[0293] 细胞增殖测定

[0294] 将细胞以 6000 细胞/孔的密度接种于 96 孔板(BD, Falcon, Bioscience, San Jose, CA, USA),并在标准条件下孵育 24 小时。然后,用不同浓度的 ChoK 抑制剂(每浓度一式四份)处理细胞并保持 72 小时。通过 MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑)法进行每孔中剩余细胞数的定量。在 VersaMax 微板酶标仪(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)上 595nm 处读取吸光度。对于酸性神经酰胺酶抑制剂的敏感化作用,在 ChoK 抑制剂处理之前,用对应于 IC₅₀ 的 NOE 预先处理细胞 4 小时。NOE(N-油酰乙醇胺)获自 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)。

[0295] 异种移植和体内肿瘤生长抑制测定

[0296] 在即将接种前,将指定细胞在 DMEM 中重悬(10⁶细胞/0.1ml),并皮下注射入 nu/

nu 免疫抑制小鼠。在按照西班牙政府部门指导的标准实验室条件下饲养小鼠。当肿瘤达到 0.1cm^3 的平均体积时,将小鼠随机分为对照组和治疗组。按照以下指定方案通过腹腔注射进行抗肿瘤剂(对于对照小鼠为介质)的治疗。通过测量大径(D)和小径(d)每周三次监测肿瘤,肿瘤体积按照 $V = (D \cdot d^2) / 2$ 来计算。使用 SPSS 软件 v. 13.0 计算肿瘤生长显著改变的统计学分析。

[0297] 使用膜联蛋白 V 进行的凋亡检测

[0298] 通过流式细胞仪、使用 Aposcreen 膜联蛋白 V 凋亡试剂盒 (Southern Biotech) 按照厂商说明分析细胞死亡。在 6 孔板中以 4×10^5 细胞 / 孔接种细胞。24 小时后,用指定化合物处理细胞。用冷 PBS 冲洗细胞 2 次,去除 PBS 后,将细胞在冷 $1 \times$ 结合缓冲液中重悬至 1×10^6 – 1×10^7 细胞 / mL 的浓度。将 $100 \mu\text{L}$ 的这些细胞收集在流式细胞仪管中,加入 $10 \mu\text{L}$ 膜联蛋白 V。轻微漩涡振荡后,将管在冰上避光孵育 15 分钟。无需洗涤,将 $380 \mu\text{L}$ $1 \times$ 结合缓冲液添加至每个样品,然后添加 $10 \mu\text{L}$ 碘化丙啶。立即用流式细胞仪分析细胞。

[0299] 通过 FACS 进行的细胞周期分析

[0300] 使用 Beckton Dickinson FACs SCAN 对固定于 70% 乙醇并用 $4 \mu\text{g/mL}$ 碘化丙啶染色的细胞 (1×10^6) 进行细胞周期分析。使用 Cell Quest 分析程序 (Becton Dickinson) 和 FlowJo 软件分析细胞计数数据。

[0301] 细胞内神经酰胺水平的测定

[0302] 将细胞以 1×10^5 细胞 / 孔接种在 6 孔板中,并且用 $[^{14}\text{C}]$ - 丝氨酸标记脂质 2 天。未更换标记的培养基处理细胞 24 小时。然后,提取脂质,并通过 TLC、使用之前描述的方法 (van Echten-Deckert, G. 2000) Sphingolipid extraction and analysis by thin-layer chromatography (通过薄层层析的鞘脂提取和分析). Methods Enzymol, 312, 64–79) 进行分析。脂质提取前,将细胞保持在 -20°C 。将细胞收获在甲醇中,并且以氯仿-甲醇-水的 60 : 30 : 6 (v/v/v) 的最终比例提取脂质。于 37°C 、 N_2 流下、在浓缩仪中干燥有机相。将样品在氯仿-甲醇 (1 : 1 v/v) 中重悬,并施加在 TLC 板上。使用氯仿-甲醇-2M 铵 (60 : 45 : 4, v/v/v) 的溶剂混合物分离脂质。通过 Instantimager (Pakard, Meriden, CT, USA) 进行定量。

[0303] LC-MS 神经酰胺和二氢神经酰胺分析

[0304] 以 8×10^5 细胞 / p100 板的密度接种细胞。24 小时后,用指定化合物处理细胞。然后,用 PBS 洗涤细胞,并通过短暂胰酶作用收集细胞。将小份细胞用于蛋白测定。制备并分析鞘脂提取物,所述提取物用内部标准 (N- 十二烷酰鞘氨醇、N- 十二烷酰葡萄糖基鞘氨醇和 N- 十二烷酰鞘氨醇磷酸胆碱,每种 0.5nmol) 确证。由 Waters Aquity UPLC 系统连接 Waters LCT Premier 正交加速飞行时间质谱 (Waters, Millford, MA) 构成的液相色谱-质谱以正离子电喷雾电离模式运行。获取 50–1500Da 的全扫描谱,将单独的谱相加以产生每 0.2s 的数据点。使用通过 LockSpray 干扰的独立参考喷雾来保持质量的准确性和可重复性。分析柱为 $100\text{mm} \times 2.1\text{mm id}$, $1.7 \mu\text{m}$ C8 Acquity UPLC BEH (Waters)。两个流动相为 A 相 : $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (74 : 25 : 1 v/v/v) ; B 相 : MeOH/HCOOH (99/1 v/v), A 相和 B 相都还含有 5mM 甲酸铵。设定梯度程序 -0.0 分钟, 80% B ; 3 分钟, 90% B ; 6 分钟, 90% B ; 15 分钟, 99% B ; 18 分钟, 99% B ; 20 分钟, 80% B。流速为 0.3mL min^{-1} 。柱保持在 30°C 。使用每种化合物提取的离子层析谱,使用 50mDa 窗进行定量。通过标准混合物上样来测定线形动态

范围。化合物的阳性鉴定是基于与标准 ($\pm 2\%$) 相比的误差 $< 5\text{ppm}$ 的准确的质量测量及其 LC 保留时间。

[0305] 通过 Western 印迹测定蛋白表达

[0306] 使用每种相应的抗体进行等量细胞裂解物 ($30\text{ }\mu\text{g}$) 的 Western 印迹分析。通过在 10% SDS-PAGE 凝胶上进行电泳解析蛋白,并转移至硝酸纤维素。将印迹在配制在 T-TBS 中的 5% 无脂干燥乳中封闭 2 小时。使用获自 BD Transduction Laboratories 的单克隆抗体 ($1:250$) (Ref. 6123012) 进行 ASAHI 的测定。作为上样对照,检测印迹的 α -微管蛋白 (Sigma T9026)。使用抗半胱天冬酶 -3 和抗 PARP 的抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 进行半胱天冬酶 -3 和 PARP 的测定。

[0307] 联合指数测定

[0308] 将如上文所述的 MTT 生长测定用于评价顺铂与 ChoK 抑制剂的联合。过夜孵育后,添加不同浓度的顺铂并孵育 3 小时。然后,添加渐增浓度的 ChoK 抑制剂孵育 40 小时,然后将细胞在新鲜培养基中再培养 24 小时。使用 Chou Talalay 的等效线图解联合指数方法 (Chou TC. et al., Trends Pharmacol Sci, 1983, 4:450-4) 在协同作用、加成作用或拮抗作用的方面分析联合测定的结果。从已有描述 (Chou TC. et al., 同上) 建立 CI 的范围。联合指数 (CI) < 1 表明两种试剂间的协同相互作用, CI = 1 表明加成相互作用, CI > 1 表明两种试剂间的拮抗作用。协同效应被认为是 CI < 1.0 的相互作用。以一式四份进行所有实验。

[0309] 统计学分析

[0310] 使用标准 Pearson 卡方统计确定事件发生率的关联。所有报道的 P 值均是双侧的。统计学显著性被定义为 $P < 0.05$ 。使用 SPSS 软件版本 13.0 (Inc, Chicago, Illinois) 进行统计学分析。

[0311] 实施例 1

[0312] NSCLC 患者中对 MN58b 的 ChoK 抑制的固有药物抗性

[0313] 为了鉴定对 MN58b 的 ChoK 特异性抑制的药物抗性的假定机制,我们在来自马德里 (西班牙) La Paz 医院的 84 名非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者中进行了临床前研究。为此,建立了来自这些患者切除的肿瘤的原代培养物并培养 10 天,其中用最高至 $20\text{ }\mu\text{M}$ 的渐增浓度的 ChoK 特异性抑制剂 MN58b 处理细胞, $20\text{ }\mu\text{M}$ 代表从人肺肿瘤产生的数种肿瘤来源的细胞系的 IC₅₀ 的 7-50 倍 (参见表 6)。如图 1 所示,观察到对于该处理的不同反应。一方面, 39 个样品 (46.4%) 的一组对 MN58b 为完全抵抗,因为几乎 100% 的细胞在第 10 天在最大药物浓度下仍然存活。另一方面,另外的 45 个肿瘤 (53.6%) 对于 MN58b 的抗增殖效应是敏感的。其中,15 个样品的一组被认为是对 MN58b 高度敏感的 (33.3%),因为在第 10 天即使在低药物浓度下细胞活力仍被完全废除。最后,30 个样品的一组 (66.7%) 被认为是对 MN58b 部分敏感的,在治疗结束时仍有约 50% 的细胞存活。

[0314] 此外,还用 NSCLC 中使用的常规治疗 (Belani CP, Lung Cancer. 2005, 50 Suppl 2: S3-8) 处理这些患者的肿瘤的原代培养物。因此,用顺铂处理这些患者的 62 个样品的细胞活力,用泰素处理相同的 62 个样品,还用吉西他滨处理这些样品中的 52 个,用长春瑞滨处理 39 个。如表 3 所示,发现 MN58b 在这些条件下是最有效的抗癌药物,因为 55.5% 对药物是敏感的,然后是具有 50% 肿瘤响应的顺铂。

[0315] 表 3. NSLCL 肿瘤对某些化疗剂的抗性的发生率。

[0316]

药物	总样品	敏感	抵抗
MN58b	63	35 (55%)	28(44.4%)
cDDP	62	31(50%)	31(50%)
泰素	62	27(43.5%)	35(56.5%)
长春瑞滨	39	15(38.5%)	24(61.5%)
吉西他滨	52	18(34.6%)	34(65.4%)

[0317] 此外,进行了不同药物间抗性相关性的统计学分析。对顺铂的抗性与对泰素、长春瑞滨和吉西他滨的抗性显著相关。当分析对泰素的抗性时也观察到相似的结果。此外,对长春瑞滨的抗性与对顺铂和泰素抗性相关,并且对吉西他滨的抗性与对泰素的抗性相关。然而,反应与对任何其它化疗剂的抗性不相关的唯一药物是 MN58b (表 4)。

[0318] 表 4. NSCLC 患者的肿瘤中对化疗剂的抗性之间的相关性

[0319]

	相关性	MN58b	cDDP	泰素	长春瑞滨	吉西他滨
MN58b	皮尔逊相关	1	-0.096	-0.09	-0.124	0.133
	Sig. (双侧)		0.46	0.488	0.45	0.346
	N	63	62	62	39	52
cDDP	皮尔逊相关	-0.096	1	0.319(*)	0.469(*)	0.074
	Sig. (双侧)	0.46		0.012	0.003	0.603
	N	62	62	62	39	52
泰素	皮尔逊相关	-0.09	0.319(*)	1	0.421(*)	0.364(*)
	Sig. (双侧)	0.488	0.012		0.008	0.008
	N	62	62	62	39	52
长春瑞滨	皮尔逊相关	-0.124	0.469(*)	0.421(**)	1	0.174
	Sig. (双侧)	0.45	0.003	0.008		0.304
	N	39	39	39	39	37
吉西他滨	皮尔逊相关	0.133	0.074	0.364	0.174	1
	Sig. (双侧)	0.346	0.603	0.008	0.304	
	N	52	52	52	37	52

[0320] *0.05 的统计学显著性 (双侧)

[0321] **0.01 的统计学显著性 (双侧)

[0322] 这些结果提示不响应于任何这些抗肿瘤治疗的 NSCLC 患者可以有效响应于基于 ChoK 抑制的治疗,因为其抗性机制不同于研究的其它 4 中药物的抗性机制。另一方面,这些结果还提示存在对于 ChoK 抑制的特定化学抗性系统。

[0323] 实施例 2

[0324] NSCLC 中对 ChoK 抑制的药物抗性机制的鉴定

[0325] 为了研究对 ChoK 抑制具有固有抗性的肿瘤与对 ChoK 抑制敏感的肿瘤的基因差异,我们分析了代表性 NSCLC 患者的肿瘤的转录特征。我们使用 Affymetrix 基因芯片人基因组 HG-U133 plus 2 微阵列来比较 5 名对 MN58b 具有抗性的肿瘤患者的一组与 5 名对该治疗高度敏感的肿瘤患者的另一组。该微阵列平台包含 54,614 探针设定,代表 47,000 个

转录物。考虑到 $-2 \leq \text{倍数变化} \leq 2$ ($-1 \leq \text{信号比} \leq 1$)，与应答者相比，抗性肿瘤样品中 912 个合格的转录物表现出显著差异性调节。为了说明差异性表达基因的生物学显著性，使用 Ingenuity 通路分析 (IPA, Ingenuity 系统) (Sorensen G., BMC Genomics. 2008, 9:114) 进行基因本体分析。

[0326] 进一步研究了发现被调节的那些基因之间的相互作用，并且发现 32 个软件指定的评分超过 20 的应答者中差异性调节的网络，这表明这些基因在输入数据集中的关联和它们之间良好的连接性。顶端通路 (Top pathway) 表明参与这些网络的基因的主要功能与细胞周期、细胞死亡、癌症、免疫应答、直脂质代谢和药物代谢有关。

[0327] 为了避免由于微阵列中存在的大量转录物而产生的假阳性率，我们使用了称为“B”的第二统计学分析，其允许进一步过滤在整个实验中差异性表达具有统计学显著性的基因 (Kim SY., Stat Methods Med Res., 2006, 15:3-20)。在该实验中，使用人样品使得该分析是高度限制性的，发现 50 个基因达到标准 ($B > 0$)。18 个基因在两种分析中是一致的 (2 倍差异性表达并且 $B > 0$)，其中 4 个在被认为是对 MN58b 具有抗性的样品中过表达，14 个下调。在这些基因中，根据这两种分析，酸性神经酰胺酶 (ASAH1) 在抗性样品中显著上调。

[0328] 实施例 3

[0329] 对 MN58b 具有抗性的肿瘤 NSCLC 细胞系中酸性神经酰胺酶的表达

[0330] 如上所述，酸性神经酰胺酶 (ASAH1) 是参与脂质代谢的酶，发现其在对 MN58b 具有抗性的那些肿瘤中按照任何选择标准都是显著过表达的。

[0331] 通过微阵列详细研究了 MN58b NSCLC 抗性细胞系中不同神经酰胺酶的行为。如表 5 所示，对 MN58b 具有抗性的 NSCLC 肿瘤中被调节的神经酰胺酶仅为酸性神经酰胺酶。此外，我们观察到，尽管按照 B 统计不是显著的模式，似乎与酸性神经酰胺酶具有相同的位置和功能的称为酸性神经酰胺酶样蛋白的鉴定出的酶在抗性样品中也是上调的 (表 5)。

[0332] 表 5. 微阵列分析测定的不同神经酰胺酶的基因表达特征。

[0333]

类型	定位	微阵列
----	----	-----

[0334]

ASAH1 (酸性神经酰胺酶 EC 3.5.1.23)	溶酶体	1.94 (2.42 * / 1.72 * / 1.70*)
ASAH2 (中性神经酰胺酶 EC 3.5.1.23)	细胞膜 (线粒体)	NC (1.03)
ASAH3 (碱性神经酰胺酶 EC 3.5.1.23)	内质网	NC (1.15)
ASAHL (酸性神经酰胺酶样蛋白 EC 3.5.1.-)	溶酶体	1.94 (2.09 / 1.78)

[0335] 基因表达的中间值。微阵列中存在的不同探针或数据。

[0336] NC:无差异性改变。*统计学显著性。

[0337] 为了证实微阵列分析中所观察到的改变与 ASAH1 基因表达的真实改变相对应,进行了使用对于该基因特异性的 taqman 探针的实时定量 PCR(Applied Biosystems 检测 Hs00602774_m1),并且也对作为阴性对照的中性和碱性神经酰胺酶(分别的 Applied Biosystems 检测 Hs00184096_m1 和 Hs00370322_m1)进行了实时定量 PCR。为此,用于微阵列分析的抗性肿瘤和应答肿瘤的 5 个样品以及每种情况的新的一批 5 个其他的患者样品被用于该分析。实时 PCR 发现:ASAH1 在抗性肿瘤中是差异性表达的,ASAH2 或 ASAH3 却不是这样,这证实了微阵列分析中获得的结果(图 2)。这些结果证实酸性神经酰胺酶在对 ChoK 抑制具有抗性的肿瘤患者中是特异性上调的,并且酸性神经酰胺酶是对 ChoK 抑制的抗性机制所提出的模型的基础(图 3)。因此,特异性抑制剂(ChoKI)对 ChoK 活性的抑制导致 PCho 水平降低。作为结果,产生 PCho 的备选途径被激活,主要在于鞘磷脂酶(SMLase)的增加的活性。该酶产生 PCho 和神经酰胺。后一代谢物是细胞死亡的强诱导剂。如果负责将神经酰胺转化为鞘氨醇的酶的活性增加,则可以产生对 ChoKI 作用的抗性。该酶是酸性神经酰胺酶(ASAH1)(图 3)。

[0338] 实施例 4

[0339] 对酸性神经酰胺酶的抑制使 NSCLC 细胞对 ChoK 抑制剂敏感化

[0340] 首先,研究了 4 个人肺肿瘤细胞系(H460 和 H1299 作为 NSCLC 细胞系;H510 和 H82 作为 SCLC)中 ASAH1 的水平。如图 4 所示,SCLC 来源的细胞系表现出的酸性神经酰胺酶水平相似于老化的对照 BEC 细胞中所发现的水平,但大大低于 NSCLC 细胞中所发现的水平。有趣的是,这些 SCLC 细胞系还表现出最高的胆碱激酶 α 水平,并且与 NSCLC 细胞相比,对 ChoK 抑制的敏感性要高得多(表 6),这提示低水平的酸性神经酰胺酶可能是 SCLC 细胞对 ChoK 抑制剂非常高的反应的至少部分原因。

[0341] 表 6. 不同人肺癌来源的细胞系对 ChoK 抑制的敏感性。

[0342]

细胞系	IC50 48h	IC50 72h	IC50 144h
原代 BEC	40.5 $\pm$ 6.2	18.3 $\pm$ 4.8	4.2 $\pm$ 0.8
原代 HMEC	44.7 $\pm$ 4.95	20.9 $\pm$ 2.7	3.4 $\pm$ 0.13
H1299	10.3 $\pm$ 2.5(4)	2.7 $\pm$ 0.7(8)	0.9 $\pm$ 0.1(4)
H460	7.03 $\pm$ 2.03(6)	2.6 $\pm$ 0.8(8)	1.1 $\pm$ 0.1(3)
H510	1.1 $\pm$ 0.1(41)	0.4 $\pm$ 0.05(53)	0.1 $\pm$ 0.03(27)
H82	1.9 $\pm$ 0.2(24)	0.8 $\pm$ 0.04(27)	0.27 $\pm$ 0.01(12)

[0343] 因此,破坏酸性神经酰胺酶水平可以允许 ChoK 抑制剂在这些细胞中具有更好的作用。为了证实该假设,我们使用了先前已被表征过的酸性神经酰胺酶抑制剂 N-油酰乙醇胺(NOE)(Grijalvo S., Chem Phys Lipids. 2006;144:69-84)来研究抑制酸性神经酰胺酶是否能使肿瘤细胞系对 ChoK 抑制剂敏感化。为此,用 NOE 预先处理 H460 细胞 3 小时以抑制酸性神经酰胺酶。然后,用渐增浓度的 ChoK α 抑制剂 MN58b 和 RSM-932A 处理细胞,并且测定了总细胞群体中 50%受到影响时的浓度(IC50)。如表 7 所述,用酸性神经酰胺酶抑制剂 NOE 预先处理 H460 细胞使细胞对 ChoK α 抑制敏感化。这些结果符合我们关于增加的酸性神经酰胺酶水平可能赋予对 ChoK 抑制的药物抗性的假设。

[0344] 表 7. 用 NOE 抑制酸性神经酰胺酶使人 NSCLC 细胞对 ChoK 抑制敏感化(对 MN58b 产生 4,7 倍;对 RSM-932A 产生 3,2 倍)。

[0345]

H460	NOE	MN58b	NOE+MN58b	RSM-932A	NOE+RSM-932A
IC ₅₀ 72h	32, 5 μ M	0, 28 μ M	0, 06 μ M	1, 11 μ M	0, 35 μ M

[0346] 为了证实这些结果,我们使用另一已知酸性神经酰胺酶抑制剂 CAY10466(CAY) (D-NMAPPD(1R,2R)-B13;10006305 Cayman Chemical) (表2中第VIII项)和作为阴性对照的碱性神经酰胺酶抑制剂D-赤式-MAPP(DMP)(10165 Cayman Chemical)进行了另外的实验。用这些化合物预先处理H460细胞3小时以抑制神经酰胺酶。然后,用渐增浓度的ChoK α 抑制剂MN58b和RSM-932A处理细胞,并且测定了总细胞群体中50%受到影响时的浓度(IC₅₀)。如表8所示,用酸性神经酰胺酶抑制剂D-NMAPPD预先处理H460细胞使细胞对ChoK α 抑制敏感化,而D-赤式-MAPP无此作用。这些结果符合我们关于增加的酸性神经酰胺酶水平可能赋予对ChoK抑制的药物抗性的假设。此外,ChoK抑制剂和酸性神经酰胺酶抑制剂的联合使用提供更强的抗癌活性。

[0347] 表8. 与用碱性神经酰胺酶特异性抑制剂D-赤式-MAPP(DMP)抑制碱性神经酰胺酶相比,用酸性神经酰胺酶特异性抑制剂CAY10466(CAY)抑制酸性神经酰胺酶使人NSCLC细胞对ChoK抑制敏感化(对MN58b产生4,3倍;对RSM-932A产生5倍)。

[0348]

对 H460 细胞的处理		IC ₅₀ (72h) μ M
胆碱酯酶抑制剂	酸性神经酰胺酶抑制剂	
-	CAY	28
-	DEM	31
MN58b	-	0,28
RSM-932A	-	1,11
MN58b	CAY	0,065
RSM-932A	CAY	0,22
MN58b	DEM	0,32
RSM-932A	DEM	1,12

[0349] 实施例 5

[0350] 对 ChoK 抑制剂具有抗性的 NSCLC 细胞的产生

[0351] 为了进一步研究对 ChoK 抑制的抗性机制以及酸性神经酰胺酶在该效应中的作用,我们使用人 NSCLC 来源的 H460 细胞系进行一系列体外实验。按照 MN58b 和第二代 ChoK α 抑制剂 RSM-932A 的轻度渐增的剂量周期将该细胞系保持培养 9 个月,我们建立了具有对这些 ChoK α 抑制剂的获得性抗性的新细胞系。还通过将 H460 保持培养相同的时间而不进行处理建立了对照细胞系(H460 储备)。因此,所建立的对 MN58b(H460 MN58R)具有抗性的和对 RSM-932A(H460 RSM-932A-R)具有抗性的细胞在正常 H460 细胞或对照 H460 储备细胞受到明显影响的浓度下不会受到影响。因此,在这些抗性细胞中用 MN58b 和 RSM-932A 抑制 50% 的细胞增殖所需的浓度(IC₅₀)显著高于对照细胞中所观察到的 IC₅₀(表 9)。此外,我们发现两种 ChoK 抑制剂之间的强交叉抗性,预计是由于这两种抗肿瘤药物作用的相似机制(表 9)。

[0352] 表 9. 具有对 ChoK 抑制剂的获得性抗性的产生的 H460 细胞系对 ChoK 抑制剂和顺

铂的敏感性

[0353]

	IC50	
	(μ M)	(μ M)
细胞系	MN58b	RSM-932A
H460	0,28	1,11
H460 储备	0,39	1,32
H460 MN58R	19,2 (49)	9,5 (7)
H460 RSM-932AR	28,8 (72)	10,8 (8)

[0354] 为了证实对响应于 ChoK α 抑制剂的死亡的耐受性是否是由于酸性神经酰胺酶水平的增加,我们进行了 QT-PCR 和 Western 印迹分析来测定这些细胞中该酶的水平。与之前的结果一致,与对照 H460 储备细胞相比,在对 ChoK 抑制具有抗性的细胞中基因表达和蛋白水平是过表达的 (图 5)。

[0355] 实施例 6

[0356] ChoK抑制剂和顺铂之间的非交叉抗性

[0357] 如上文所述,在来自 NSCLC 患者的肿瘤原代培养物中进行的对不同化疗剂的反应者的相关性统计学分析表明:对 MN58b 的抗性与对任何其它受试抗癌药物的抗性不相关 (表 4)。为了证实获自患者样品的数据和确定对 ChoK 抑制的抗性机制与对 NSCLC 治疗中常规使用的其它抗肿瘤药物的抗性无关,我们分析了顺铂在建立的对 ChoK 抑制具有抗性的细胞中的抗增殖作用。如表 10 所示,H460 MN58R 和 H460 RSM-932AR 对顺铂的抗增殖作用比母体 H460 细胞更敏感。这些结果提示对 ChoK 抑制的抗性的获得经历可能是与酸性神经酰胺酶过表达相关的特定机制,并不会干扰诸如顺铂的其它抗癌药的作用机制。

[0358] 表 10. 对 ChoK 抑制剂具有抗性的细胞比母体人 NSCLC 细胞对顺铂更敏感。

[0359]

	IC50 (ug/mL)
细胞系	顺铂
H460	5
H460 储备	4, 5
H460 MN58R	2 (0, 4)
H460 RSM-932AR	1, 5 (0, 3)

[0360] 实施例 7

[0361] NSCLC中顺铂和 ChoK抑制剂的联合治疗的有效性

[0362] 上文所示结果提示 ChoK 抑制剂可被用作不响应于顺铂的 NSCLC 患者的抗肿瘤剂,并且反之亦然。然后,分析了 ChoK 抑制剂和用顺铂进行的常规基于铂的治疗的联合治疗的潜在效应。使用 MTT 测定、在 NSCLC 细胞系 H460 中评价了顺铂加 ChoK 抑制剂 MN58b 和 RSM-932A 对细胞活力的影响。进行了相继处理,其中给予顺铂 3 小时,然后给予 ChoK 抑制剂 40 小时。使用 Chou Talalay 的等效线图解联合指数法 (Chou et al., 同上) 分析结果。如图 6 所示,在 H460 细胞中,在顺铂与 MN58b 或 RSM-932A ChoK 抑制剂之间都观察到强的协同 (CIs < 0.5) 生长抑制 (分别为 CI = 0.1 和 CI = 0.4),这表明这两种治疗的联合可以在控制 NSCLC 肿瘤生长中产生显著的优势。

[0363] 为了证实这两种治疗的联合可以在控制 NSCLC 肿瘤生长中得到显著的优势,进行了使用 NSCLC 异种移植物的体内实验。根据体外实验的发现,进行了体内相继治疗,其中第一周给予顺铂(一周两次),然后是两周的 ChoK 抑制剂治疗(一周三次)。还包括在三周中同时进行 MN58b 和顺铂治疗的另外一组。如图 7 所示,在 H460 异种移植物中,在顺铂和 MN58b(图 7A)或 RSM-932A(TCD-717)(图 7B)ChoK 抑制剂之间都观察到强的协同生长抑制,但没有增加的毒性(图 7C),这表明这两种治疗的联合可以在控制 NSCLC 肿瘤生长中产生显著的优势。

[0364] 应当注意到,如果单独使用顺铂获得与使用联合方案相同比例的抗肿瘤活性,顺铂的浓度需要变为 4 倍,并且观察到诸如体重丢失的毒性临床指征(图 7D)。因此,顺铂和 ChoK 抑制剂的相继联合治疗导致了强的抗肿瘤效应,同时将毒性降低至微弱的水平,所述水平与使用降低 2 倍的化疗剂浓度时所获的水平相似。

[0365] 实施例 8

[0366] 胆碱激酶抑制剂和 TRAIL 在结肠癌来源的细胞系中协作诱导细胞死亡

[0367] 为了研究 RSM-932A 和 TRAIL 的抗肿瘤活性是否遵照相似或不同的作用机制,测试了胆碱激酶抑制剂(ChoKI)和 TRAIL 的组合在肿瘤细胞的细胞毒性中的协作效应。为此,使用了 5 种结肠癌来源的细胞系:DLD-1、HT-29、HCT-116、SW620 和 SW480。

[0368] 为此,在处理前 24 小时,将细胞以 1×10^4 细胞/孔的密度接种于 96 多孔板。用不同浓度的 RSM-932A(ChoKI)或 TRAIL 处理细胞不同时间,并使用 MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑]比色测定将细胞增殖进行定量。

[0369] 结果表明:对 ChoKI 的敏感性在所有分析的细胞系中非常相似(图 8A)。然而,对 TRAIL 的敏感性对于所有细胞系也非常相似,除了 SW620,SW620 对 TRAIL 处理几乎是抵抗的(图 8B)。然后,用 TRAIL 处理已经用 ChoKI 预先处理 2 小时而足以达到对胆碱激酶的有效抑制的相同细胞系,持续 24 小时。当单独用 ChoKI 或 TRAIL 处理 DLD-1 细胞时,按照观察到的细胞死亡的百分比测定,细胞毒性分别为 53%和 12%。当联合两种药物时,毒性增加至 75%细胞死亡(图 9A)。在 HT-29 细胞中,ChoKI 和 TRAIL 诱导的细胞毒性分别为 48%和 18%,而联合时细胞毒性增加至 81%(图 9B)。在对 TRAIL 具有抗性的 SW620 细胞中,ChoKI 细胞毒性为 9%,而联合时细胞毒性增加至 41%(图 9C)。通过 Western 印迹分析证实了该结果,因为当 TRAIL 和胆碱激酶抑制剂联合时,还存在 PARP 降解或半胱天冬酶 3 活化的增加(图 9D)。

[0370] 使用 Chou Talalay 的等效线图解联合指数法(Chou et al.,同上)分析在本实施例中指定为 ChoKI 的 RSM-932A(TCD-717)和 TRAIL 之间的协作结果。如图 10 所示,在这些化合物之间观察到强的协同($CI_s < 0.5$)生长抑制(对于 DLD-1 $CI = 0.19$,对于 HT-29 $CI = 0.12$,对于 SW620 $CI = 0.085$),这表明这两种治疗的联合可以在控制结肠肿瘤生长中产生显著的优势。在 DLD-1 和 SW620 细胞中使用 ChoK 抑制剂 MN58b 验证了这些结果,获得了相似结果(分别为 $CI = 0.10$ 和 $CI = 1.15$)(图 10)。

[0371] 还通过流式细胞仪分析体外观察到的协同作用,其中使用膜联蛋白 V 和 IP 染色来区分凋亡和坏死或晚期凋亡。用 MN58b 处理 7 小时后,DLD-1 细胞的凋亡仅有少量增加,因为 MN58 需要多于 7 小时来诱导肿瘤细胞死亡。当单独用 TRAIL 处理 DLD-1 细胞时,存在 35%的凋亡。在联合时,肿瘤细胞死亡增加至 50%。当用 RSM-932A(TCD-717)和

TRAIL 联合处理 DLD-1 时,肿瘤细胞死亡增加 55%,但主要是坏死或晚期凋亡群体,因为 RSM-932A(TCD-717) 具有快于 MN58 的作用。在对 TRAIL 具有抗性的 SW620 中,当与 MN58 联合时凋亡群体也增加至 35%。当 TRAIL 与 RSM-932A(TCD-717) 联合时,处理 7 小时后坏死或晚期凋亡群体增加,并且存在 59%的总细胞死亡(图 11),这证实了结肠癌细胞中 TRAIL 和 ChoK 抑制剂联合的协同效应。

[0372] TRAIL 是肿瘤坏死因子(TNF)超家族的成员,并且可以通过刺激死亡受体 DR4(TNFRSF10A 或 TRAIL-R1) 和 DR5(TNFRSF10B 或 TRAIL-R2) 的外部途径诱导凋亡。为了确定 TRAIL 和 ChoK 抑制剂联合处理的功效的,通过定量 PCR 分析了用 MN58b、TRAIL 或其同时联合处理的 DLD-1 和 SW620 细胞系中 DR5 和 DR4 的水平。对于 DR4 水平,未发现显著改变,但是 MN58b 处理增加 DR5 水平,导致了 SW620 细胞系中增加 2 倍并且 DLD-1 细胞系中增加 1.6 倍(图 12),这可以解释在 ChoK 抑制剂和 TRAIL 之间观察到的协同效应的作用机制。

[0373] MN58b 和 TRAIL 已被描述为能增加细胞内神经酰胺水平。为了研究该系统中的神经酰胺生成,在用 MN58 或 TRAIL 处理 DLD-1 细胞前,用 [14 C]-丝氨酸标记细胞内脂质 48 小时。提取后,通过薄层层析分析脂质并进行定量。如图 13 中所示,当 MN58b 和 TRAIL 同时联合时,神经酰胺水平增加 3 倍。此外,之前已有的描述是,SW620 对 TRAIL 的抗性与神经酰胺信号转导的缺陷相关,并可以由外源神经酰胺克服。因此,处理后 SW620 中 C16-神经酰胺未增加。为了研究 ChoK 抑制是否与产生 C16-神经酰胺相关,通过液相色谱和质谱分析了神经酰胺种类,当 MN58b 和 TRAIL 联合时获得了 C16-神经酰胺增加 50%(图 13)。

[0374] 最后,还使用裸小鼠中的异种移植物模型进行了体内联合治疗。当肿瘤达到 0.15cm³的体积时,开始同时联合治疗。每组包括 10 只小鼠。星期一、星期三和星期五用 MN58b(2mg/kg) 治疗小鼠,星期二和星期四用 20mg/kg TRAIL 治疗小鼠。如图 14 所示,治疗三周后,在 DLD-1 和 SW620 异种移植物中分别获得 68%和 75%的肿瘤生长抑制,这证实了体外实验中所观察到的强协同作用。

[0375] 实施例 9

[0376] 胆碱酯酶抑制剂和 5-FU 协作诱导结肠癌来源的细胞系中的细胞死亡

[0377] 此外,还分析了 ChoK 抑制剂和结肠癌中基于 5-氟尿嘧啶(5-FU) 的常规治疗的联合治疗的潜在效应。使用 MTT 测定、在 DLD-1、SW620 和 HT-29 细胞中评价了 5-FU 加 ChoK 抑制剂 MN58b 和 RSM-932A(TCD-717) 对细胞活力的影响。最佳联合选择被鉴定为同时治疗或如下的相继治疗:短的给予 ChoK 抑制剂的时间(9-24 小时),然后是较长的给予 5-FU 的时间(48-72 小时)。使用 Chou Talalay 的等效线图解联合指数法(Chou et al., 同上) 分析了结果。如图 15 所示,在所有分析的人结肠癌细胞中,在 5-FU 和 MN58b 或 RSM-932A ChoK 抑制剂之间都观察到对生长抑制的协同效应,这表明这两种处理的联合可以在控制结肠肿瘤生长中产生显著的优势。

[0378] 还通过流式细胞仪分析验证了这些结果。如图 16 所示,细胞周期分析不仅说明即使使用低浓度的这些试剂联合治疗也导致细胞死亡的显著增加,而且还说明 ChoK 抑制剂表现出在细胞周期的 G0/G1 期中的作用,按照已有报道,5-FU 通过影响细胞周期的 G2/M 期发挥其作用。这些结果为以下提供了证据:当进行为了使细胞对 5-FU 抗增殖效应敏感化的联合治疗时,需要用 ChoK 抑制剂预先治疗。

[0379] 为了进一步研究 ChoKI 使 5-FU 抗肿瘤效应敏感化的机制,使用 affymetrix 技术、

进行了用 MN58b 和 RSM-932A 处理不同时间的 H460 细胞中 5-FU 代谢通路的基因表达分析。如表 11 所示,该通路的某些基因受到 ChoK 抑制剂显著且共同的影响,这提示 ChoK 抑制剂的预先处理改变了增强 5-FU 效应的酶的表达。

[0380] 表 11. 通过 affymetrix 基因表达检测测定的用 ChoK 抑制剂处理的 H460 细胞中 5-FU 代谢通路的基因表达分析。

[0381]

官方标识		基因	RSM-932A		MN58b	
			9 小时	24 小时	9 小时	24 小时
UPP1	UP	尿苷磷酸化酶 1	+1.83	+2.48	+1.54	+1.76
RRM2	RRM2	核糖核苷酸还原酶	-1.39	-3.69	-1.48	-2.50
TYMS	TS	胸苷酸合成酶	-1.03	-2.73	-1.30	-2.39
DUT	DUT	脱氧尿苷三磷酸酶	-1.12	-2.08	-1.17	-2.03

[0382] 因为 H460 是 NSCLC 来源的细胞,使用 QT-PCR 技术在 3 种不同结肠来源的癌细胞中证实了这些结果,这是为了确定 5-FU 诱导细胞死亡增强的该机制是否是细胞依赖性的,以及该通路基因表达水平的改变是否可以解释结肠癌系统中发现的 ChoKI 敏感化作用。如表 12 所示,该通路在所有分析的癌细胞中发生了相似程度的显著改变,这提示对 5-FU 代谢的改变可能是该联合治疗的作用机制。

[0383] 表 12. DLD-1、HT29 和 SW62 结肠癌细胞中,用 ChoK 抑制剂 RSM-932A (932A) 和 MN58b (MN58b) 处理后的 5-FU 代谢通路基因 (DUT:脱氧尿苷三磷酸酶;RRM:核糖核苷酸还原酶;TYM:胸苷酸合成酶;UPP:尿苷磷酸化酶 1) 表达改变的 PT-PCR 验证。DR(下调);UR(上调)

[0384]

DLD-1	DUT	RRM	TYM	UPP
932A	DR	DR	DR	UR
MN58b			DR	UR

[0385]

HT29	DUT	RRM	TYM	UPP
932A	DR	DR	DR	UR
MN58b	DR	DR	DR	

[0386]

SW62	DUT	RRM	TYM	UPP
932A	DR	DR	DR	UR
MN58b		DR	DR	UR

[0387] 最后,为了证实这两种治疗的联合可以在控制 NSCLC 肿瘤生长中产生显著的优势,进行了使用两种不同结肠异种移植物的体内实验。根据体外实验的发现,在体内进行了同时治疗或如下的相继治疗:第一周给予 ChoK 抑制剂 MN58b 或 RSM-932A (一周三次),然后是两周体内 5-FU 治疗(一周两次)。如图 17 所示,使用 DLD-1 和 SW620 异种移植植物时都观察到 5-FU 和 ChoK 抑制剂之间的强的协同生长抑制,这提示这两种治疗的联合可以在控制结肠肿瘤生长中产生显著的优势。

[0001]

序列表

<110> 特拉斯雷神诺癌症医药有限公司

<120> 用于治疗癌症的方法和组合物

<130> 11C80183CN

<150> EP08380270.2

<151> 2008-09-17

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

atggcggccg aggcgacagc tgtggccgga agcggggctg ttggcggctg cctggccaaa	60
gacggcttgc agcagtctaa gtgcccggac actaccccaa aacggcggcg cgcctcgtcg	120
ctgtcgcgtg acgccgagcg ccgagcctac caatggtgcc gggagtactt gggcggggcc	180
tggcgccgag tgcagcccga ggagctgagg gttaccccg tgagcggagg cctcagcaac	240
ctgctcttcc gctgctcgct cccggaccac ctgcccagcg ttggcgagga gcccgggag	300
gtgcttctgc ggctgtacgg agccatcttg cagggcgtgg actccctggt gctagaaagc	360
gtgatgttcg ccatacttgc ggagcggtcg ctggggcccc agctgtacgg agtcttccca	420
gagggccggc tggaacagta catcccaagt cggccattga aaactcaaga gcttcgagag	480
ccagtgttgt cagcagccat tgccacgaag atggcgcaat ttcatggcat ggagatgcct	540
ttcaccaagg agccccactg gctgtttggg accatggagc ggtacctaaa acagatccag	600
gacctgcccc caactggcct ccctgagatg aacctgctgg agatgtacag cctgaaggat	660
gagatgggca acctcaggaa gttactagag tctaccccat cgccagtcgt cttctgccac	720
aatgacatcc aggaaggga catcttgctg ctctcagagc cagaaaatgc tgacagcctc	780
atgctggttg acttcgagta cagcagttat aactataggg gctttgacat tgggaaccat	840
ttttgtgagt gggtttatga ttatactcac gaggaatggc ctttctacaa agcaaggccc	900
acagactacc ccaactcaaga acagcagttg cattttattc gtcattacct ggcagaggca	960
aagaaagggtg agaccctctc ccaagaggag cagagaaaac tggaagaaga tttgctggta	1020
gaagtcagtc ggtatgctct ggcateccat ttcttctggg gtctgtggtc catcctccag	1080

[0002]

gcattccatgt ccaccataga atttggttac ttggactatg cccagtctcg gttccagttc 1140

tacttccagc agaaggggca gctgaccagt gtccactcct catcctag 1188

<210> 2
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Ala Ala Glu Ala Thr Ala Val Ala Gly Ser Gly Ala Val Gly Gly
 1 5 10 15

Cys Leu Ala Lys Asp Gly Leu Gln Gln Ser Lys Cys Pro Asp Thr Thr
 20 25 30

Pro Lys Arg Arg Arg Ala Ser Ser Leu Ser Arg Asp Ala Glu Arg Arg
 35 40 45

Ala Tyr Gln Trp Cys Arg Glu Tyr Leu Gly Gly Ala Trp Arg Arg Val
 50 55 60

Gln Pro Glu Glu Leu Arg Val Tyr Pro Val Ser Gly Gly Leu Ser Asn
 65 70 75 80

Leu Leu Phe Arg Cys Ser Leu Pro Asp His Leu Pro Ser Val Gly Glu
 85 90 95

Glu Pro Arg Glu Val Leu Leu Arg Leu Tyr Gly Ala Ile Leu Gln Gly
 100 105 110

Val Asp Ser Leu Val Leu Glu Ser Val Met Phe Ala Ile Leu Ala Glu
 115 120 125

Arg Ser Leu Gly Pro Gln Leu Tyr Gly Val Phe Pro Glu Gly Arg Leu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Ile Pro Ser Arg Pro Leu Lys Thr Gln Glu Leu Arg Glu
 145 150 155 160

Pro Val Leu Ser Ala Ala Ile Ala Thr Lys Met Ala Gln Phe His Gly
 165 170 175

Met Glu Met Pro Phe Thr Lys Glu Pro His Trp Leu Phe Gly Thr Met

[0003]

180	185	190
Glu Arg Tyr Leu Lys Gln Ile	Gln Asp Leu Pro Pro	Thr Gly Leu Pro
195	200	205
Glu Met Asn Leu Leu Glu Met Tyr Ser Leu Lys Asp Glu Met Gly Asn		
210	215	220
Leu Arg Lys Leu Leu Glu Ser Thr Pro Ser Pro Val Val Phe Cys His		
225	230	235 240
Asn Asp Ile Gln Glu Gly Asn Ile Leu Leu Leu Ser Glu Pro Glu Asn		
	245	250 255
Ala Asp Ser Leu Met Leu Val Asp Phe Glu Tyr Ser Ser Tyr Asn Tyr		
	260	265 270
Arg Gly Phe Asp Ile Gly Asn His Phe Cys Glu Trp Val Tyr Asp Tyr		
	275	280 285
Thr His Glu Glu Trp Pro Phe Tyr Lys Ala Arg Pro Thr Asp Tyr Pro		
	290	295 300
Thr Gln Glu Gln Gln Leu His Phe Ile Arg His Tyr Leu Ala Glu Ala		
305	310	315 320
Lys Lys Gly Glu Thr Leu Ser Gln Glu Glu Gln Arg Lys Leu Glu Glu		
	325	330 335
Asp Leu Leu Val Glu Val Ser Arg Tyr Ala Leu Ala Ser His Phe Phe		
	340	345 350
Trp Gly Leu Trp Ser Ile Leu Gln Ala Ser Met Ser Thr Ile Glu Phe		
	355	360 365
Gly Tyr Leu Asp Tyr Ala Gln Ser Arg Phe Gln Phe Tyr Phe Gln Gln		
	370	375 380
Lys Gly Gln Leu Thr Ser Val His Ser Ser Ser		
385	390	395

<210> 3
<211> 21

[0004]

<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 对ChoK α 特异性的shRNA 的序列

<400> 3
aactgatgct cattgatttc g 21

<210> 4
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工

<220>
<223> 对胆碱激酶特异性的SiRNA

<400> 4
caugcuguuc cagugcucc 19

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 如Morales et al (Oncogene, 2007, 26:905-916)中所述
的对酸性神经酰胺酶特异性的siRNA

<400> 5
aaaatcaacc tatectcett c 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 如W02007136635中所示的对酸性神经酰胺酶特异性的siRNA

<400> 6
aatcaaccta tcctcettca g 21

<210> 7
<211> 281
<212> PRT
<213> 人

<400> 7
Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys
1 5 10 15

[0005]

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
 20 25 30
 Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
 35 40 45
 Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
 50 55 60
 Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
 65 70 75 80
 Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
 85 90 95
 Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
 100 105 110
 Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 115 120 125
 Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 130 135 140
 Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 165 170 175
 His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 180 185 190
 Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 195 200 205
 Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 210 215 220
 Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 225 230 235 240

[0006]

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

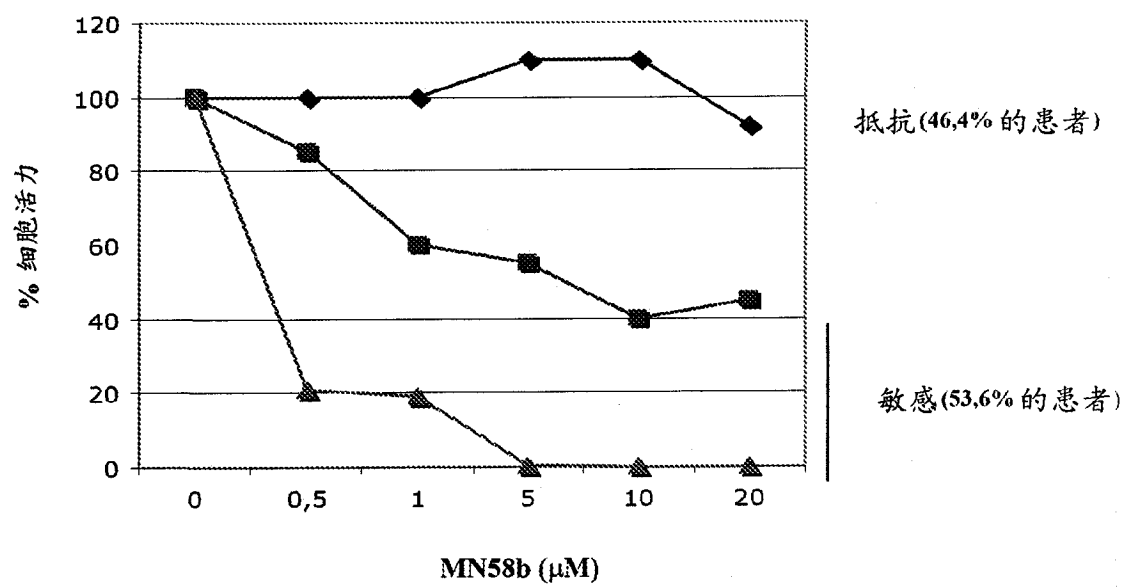


图 1

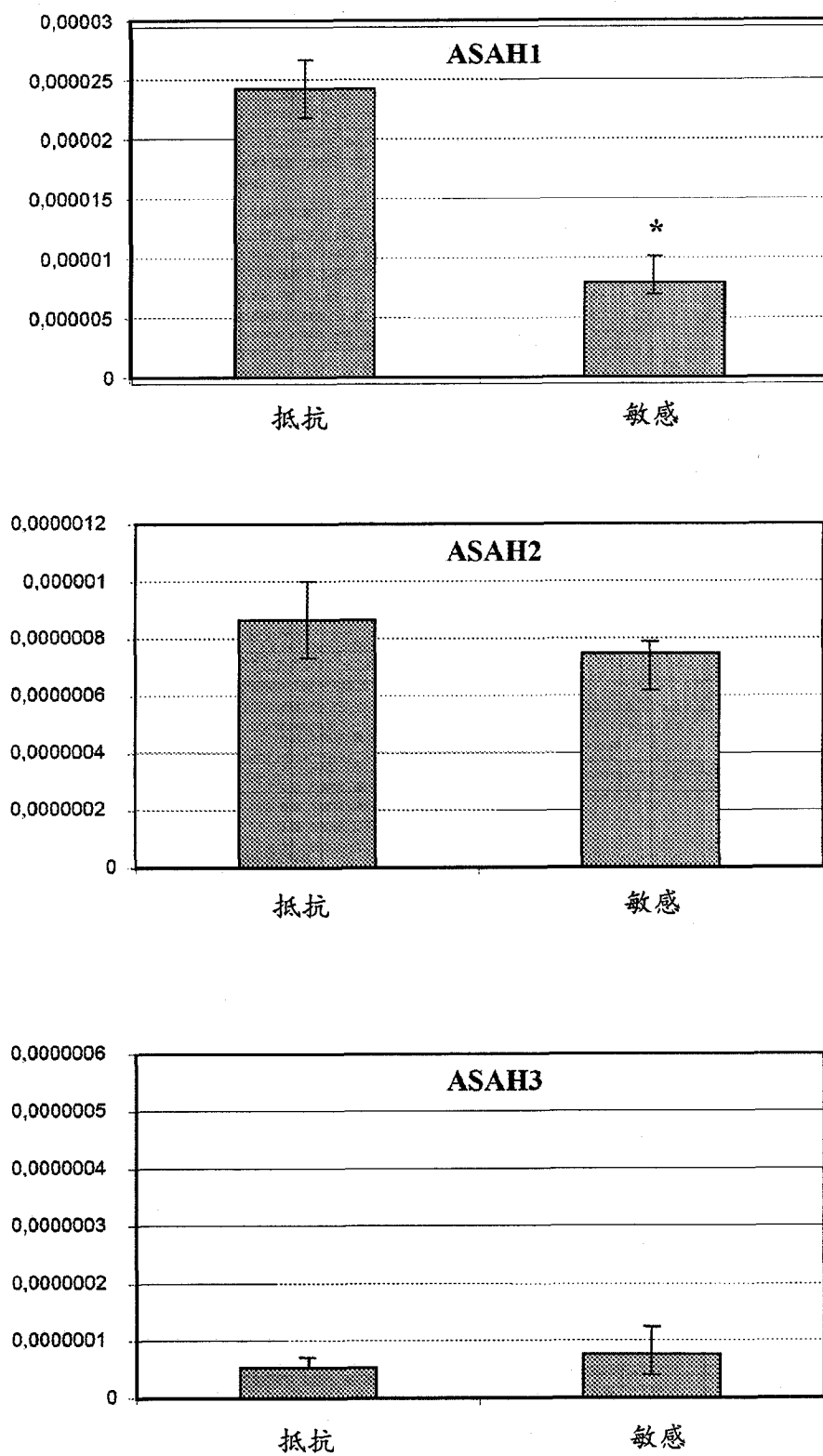


图 2

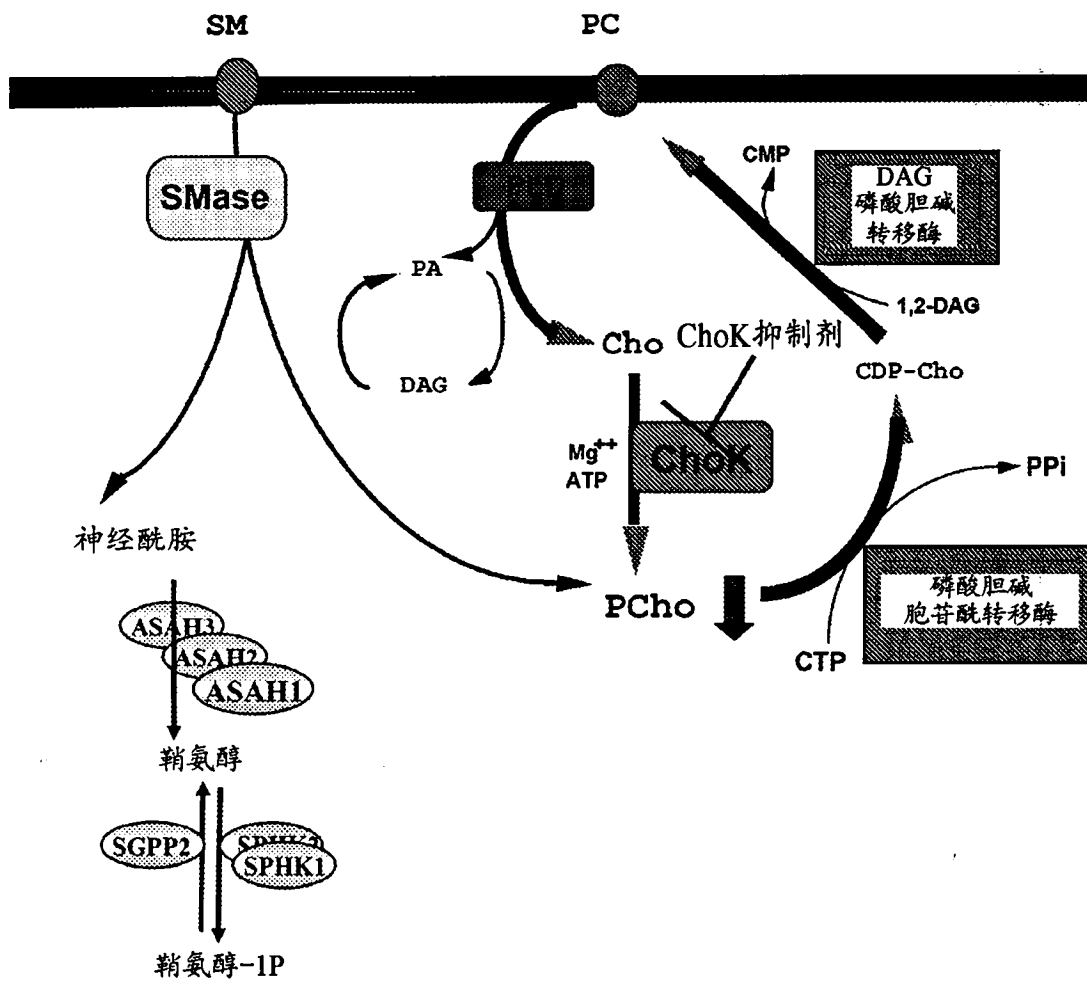


图 3

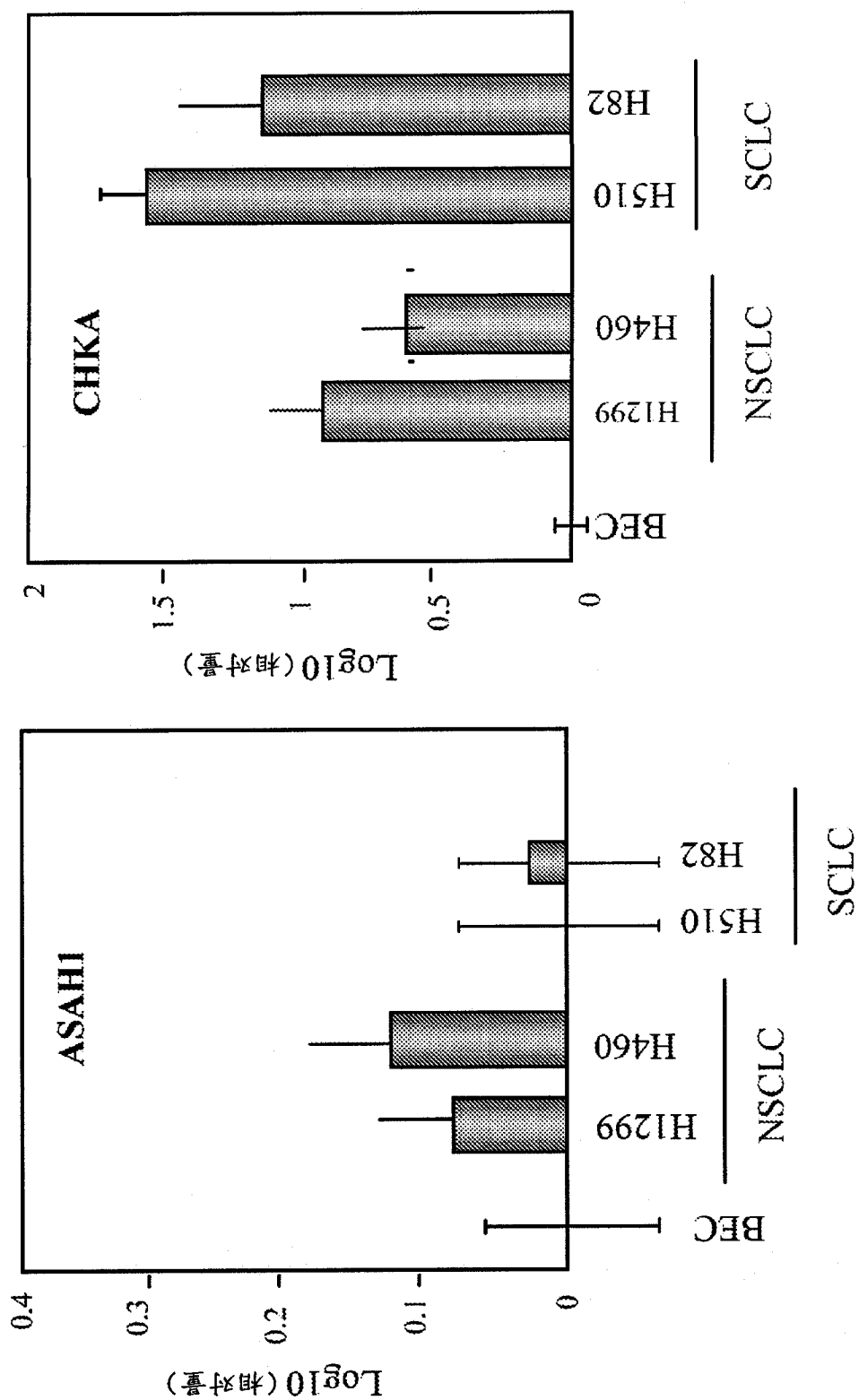


图 4

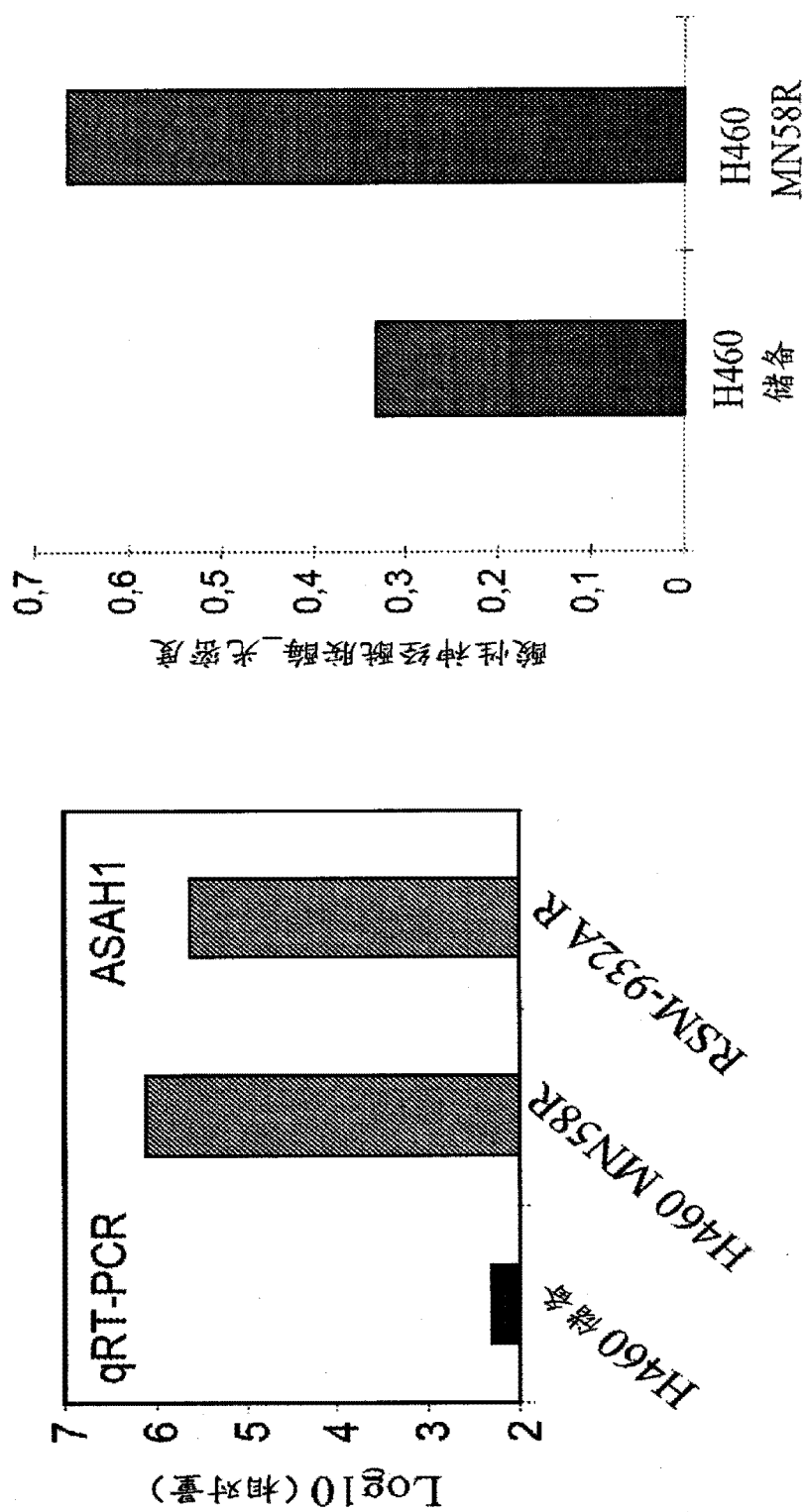


图 5

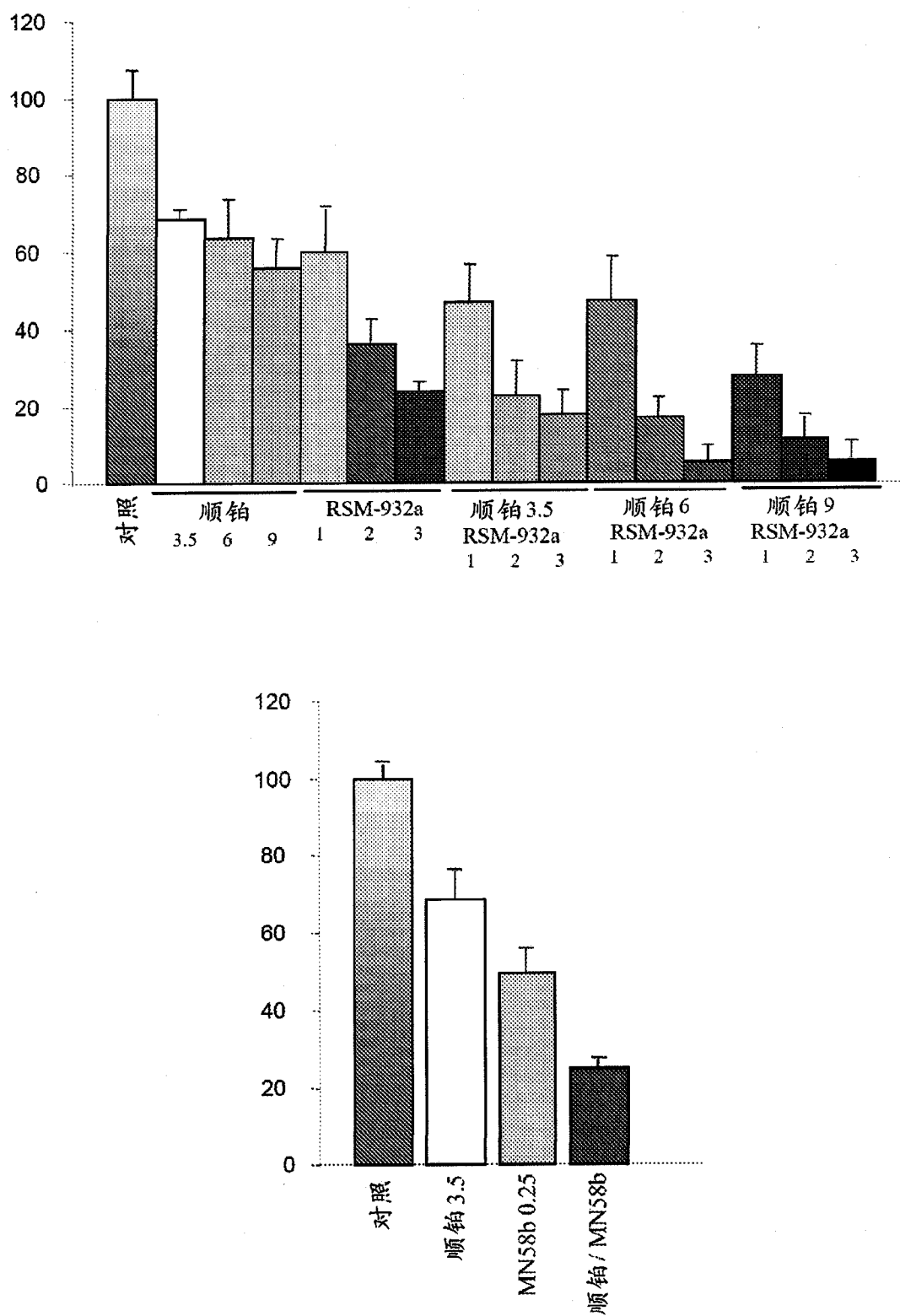


图 6

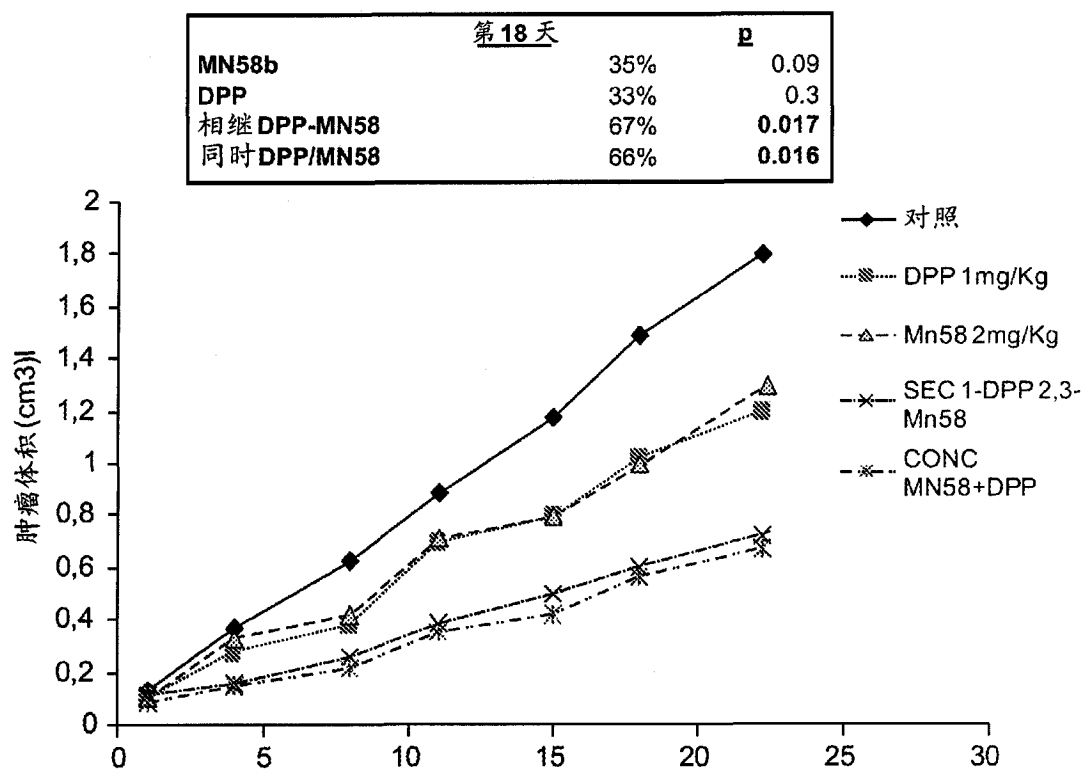


图 7A

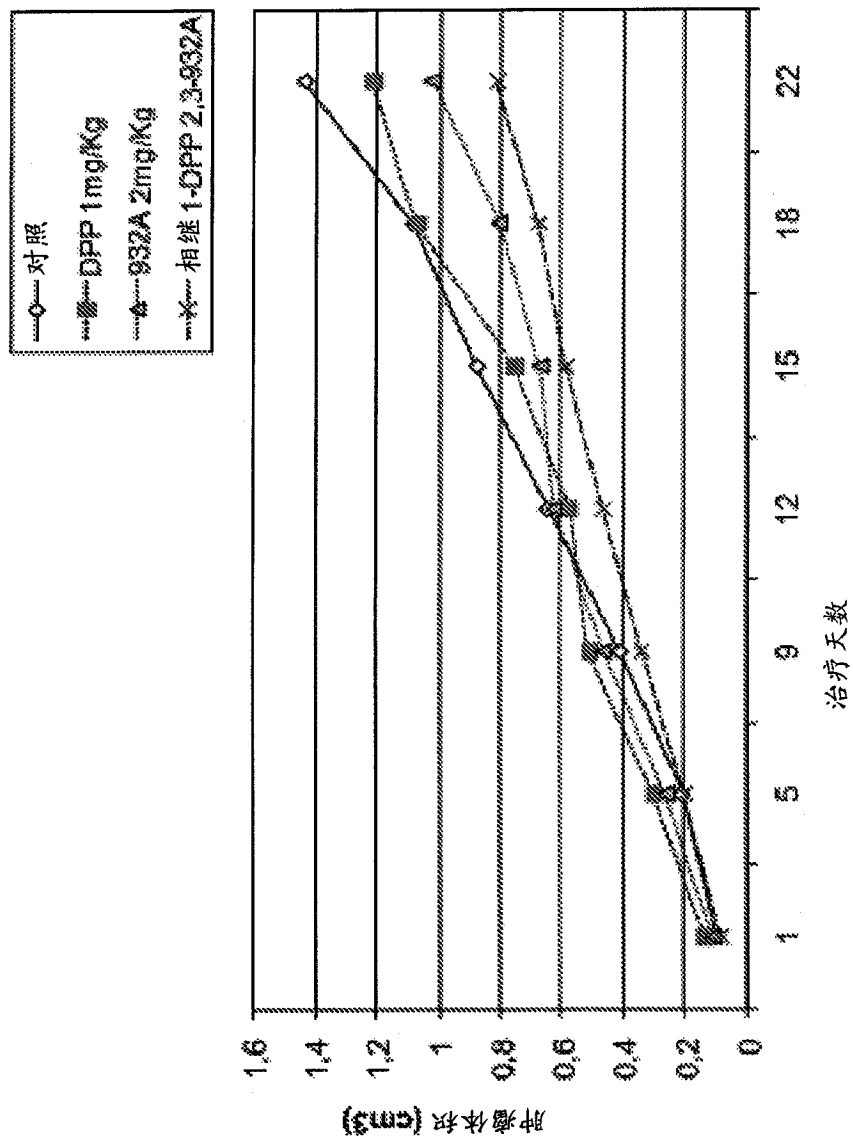


图 7B

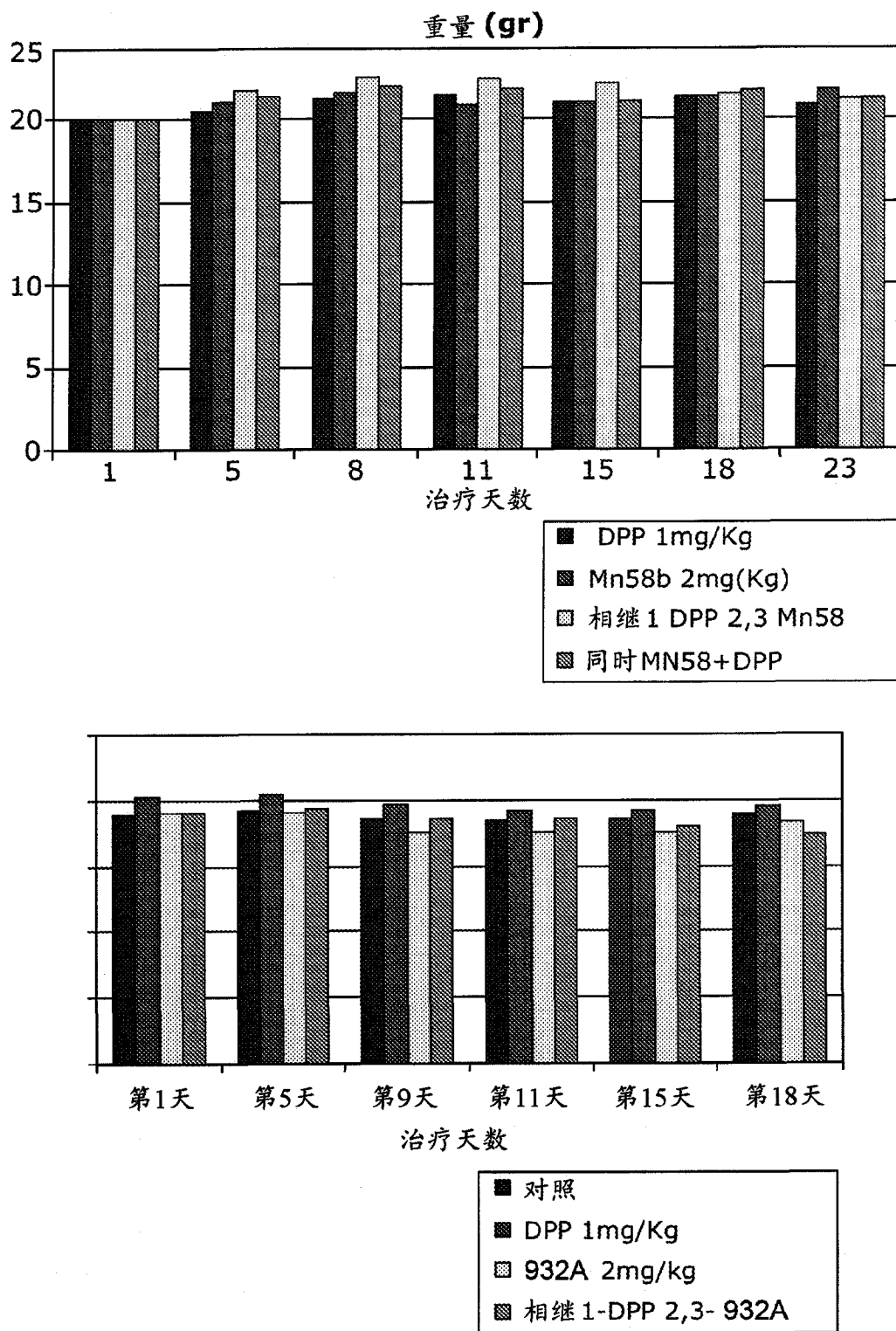


图 7C

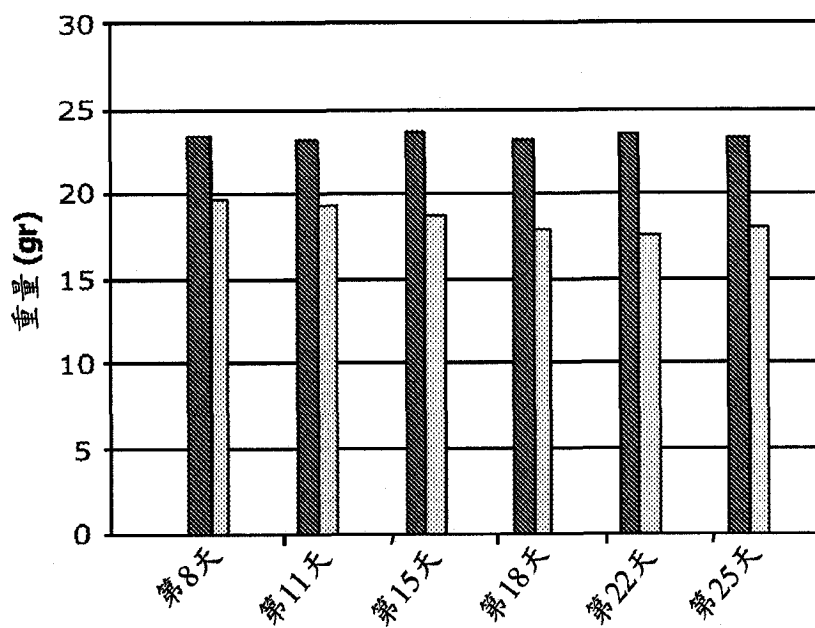
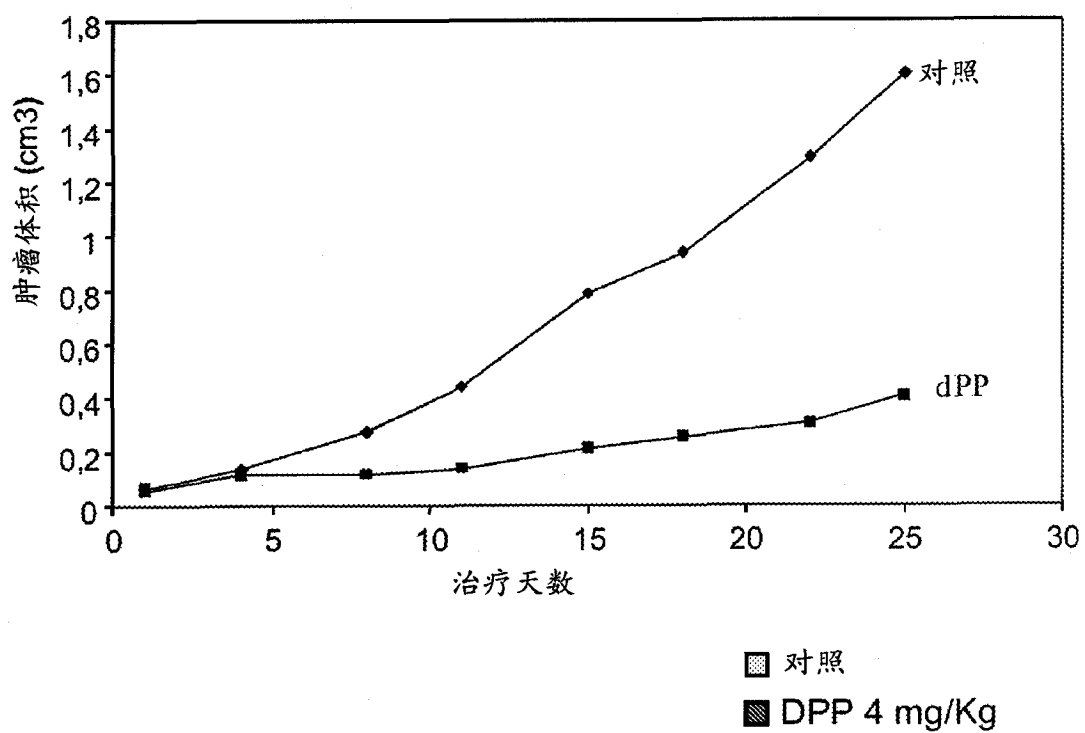


图 7D

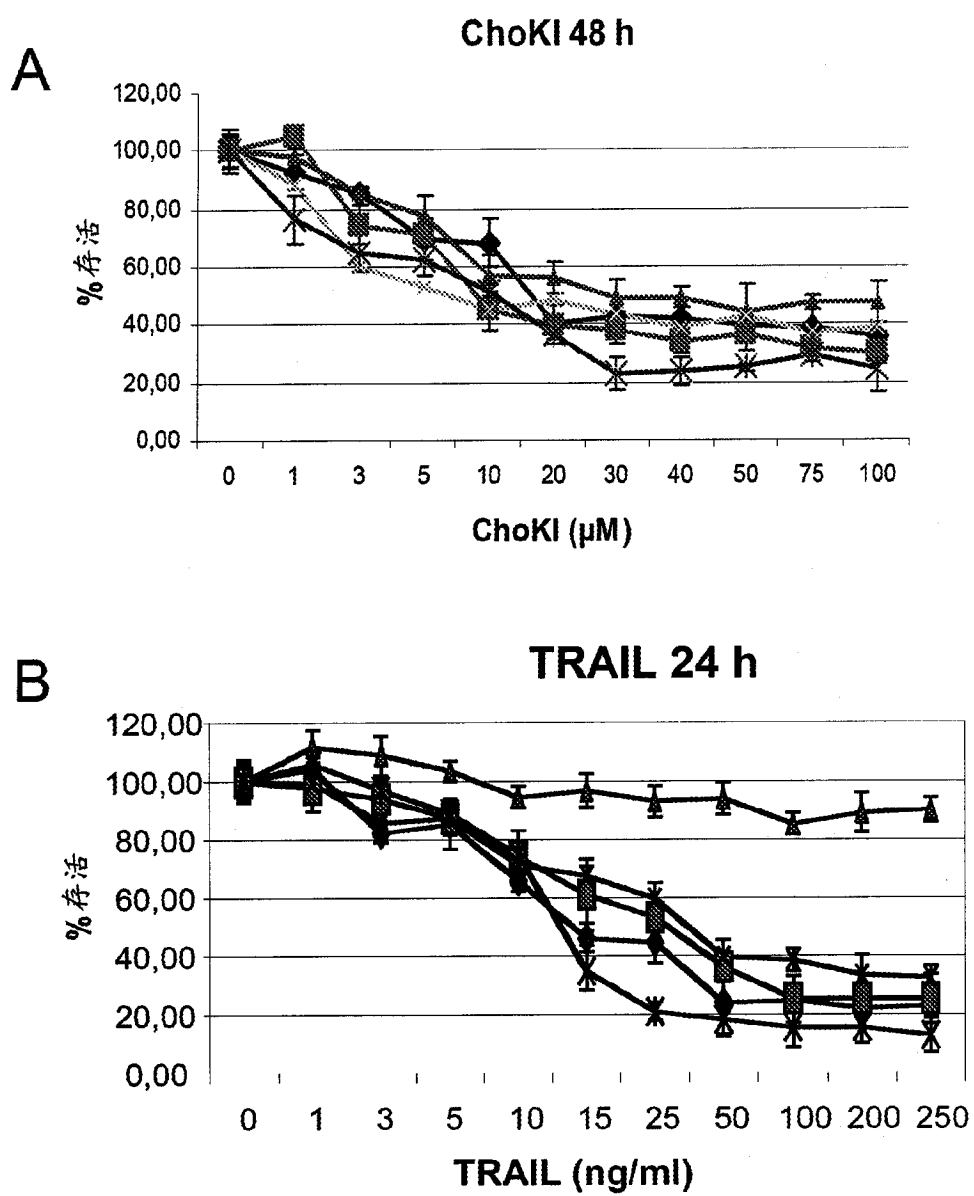


图 8

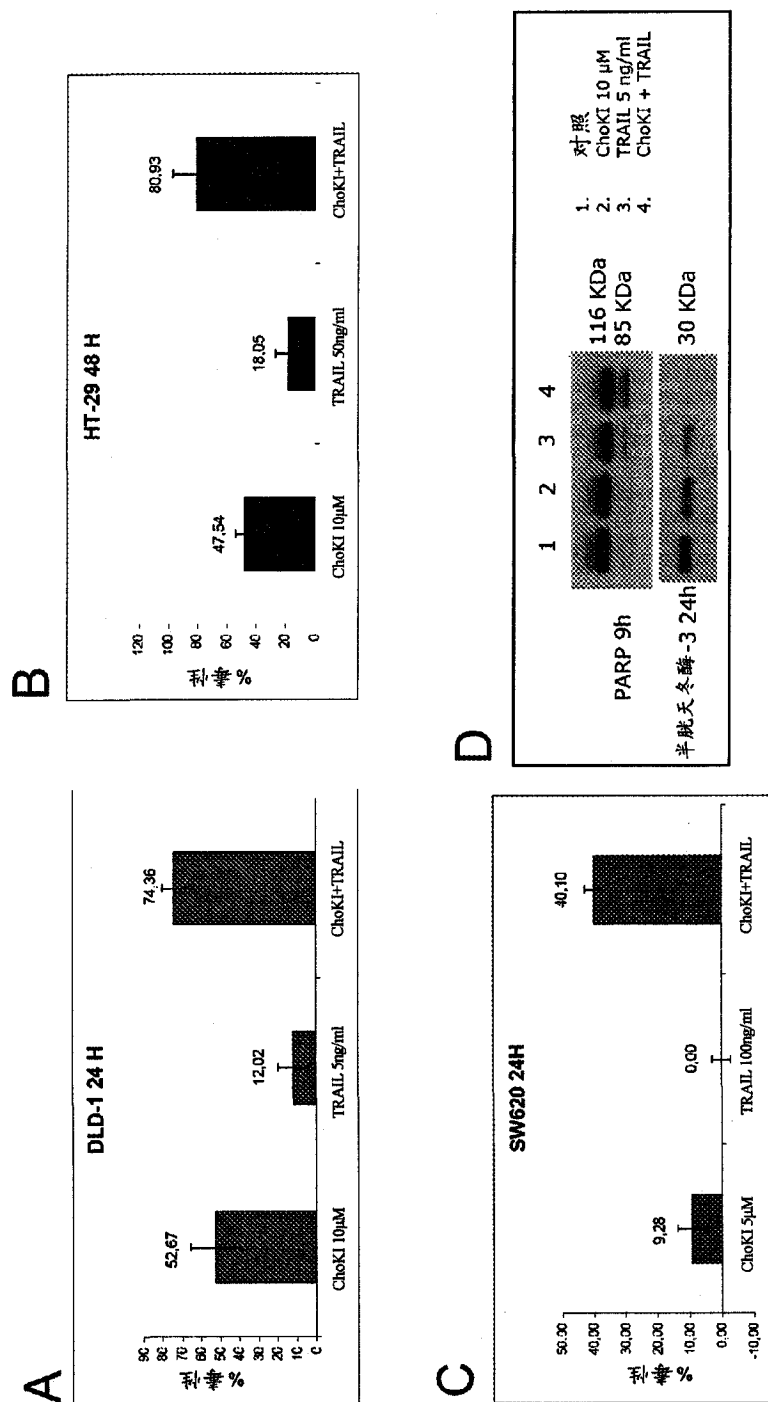


图 9

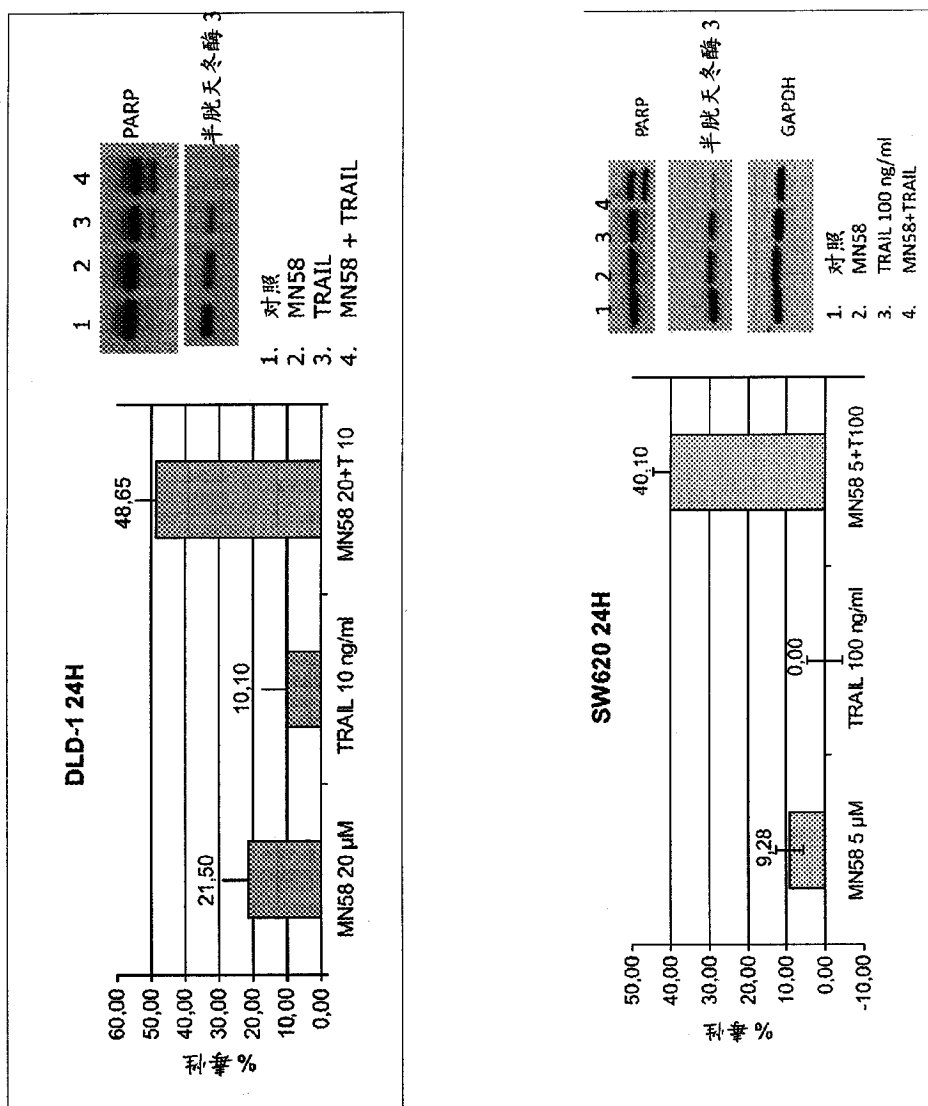
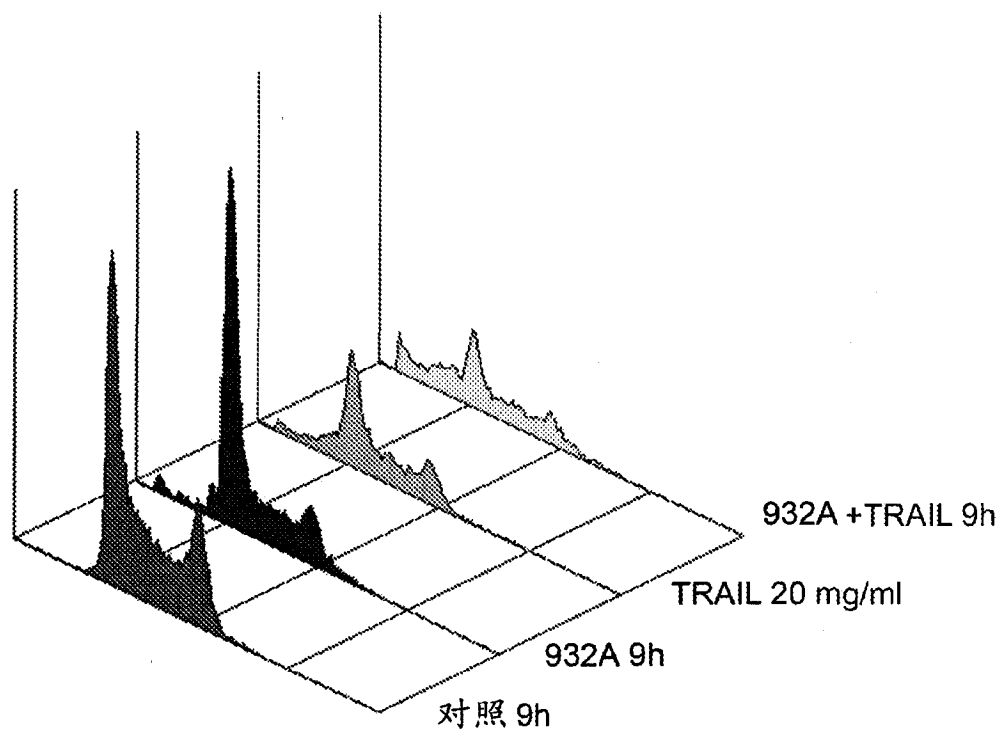


图 10

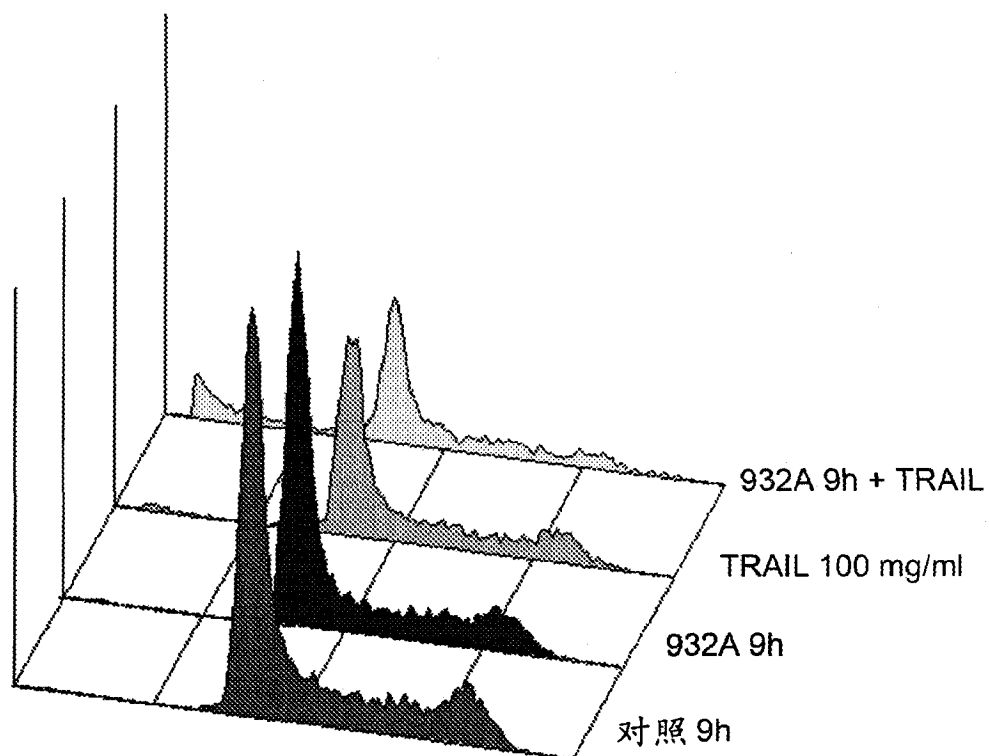
DLD-1细胞中RSM-932A/TRAIL



9h	调亡	G0/G1	S	G2/M
对照	1,4	44,7	33,5	20,4
RSM-932A 15 μ M	8,1	57,2	21	12,9
TRAIL 20ng/ml	10,8	47,3	23,3	18,5
RSM-932A+ TRAIL	33,4	28,8	17	18,3

图 11A

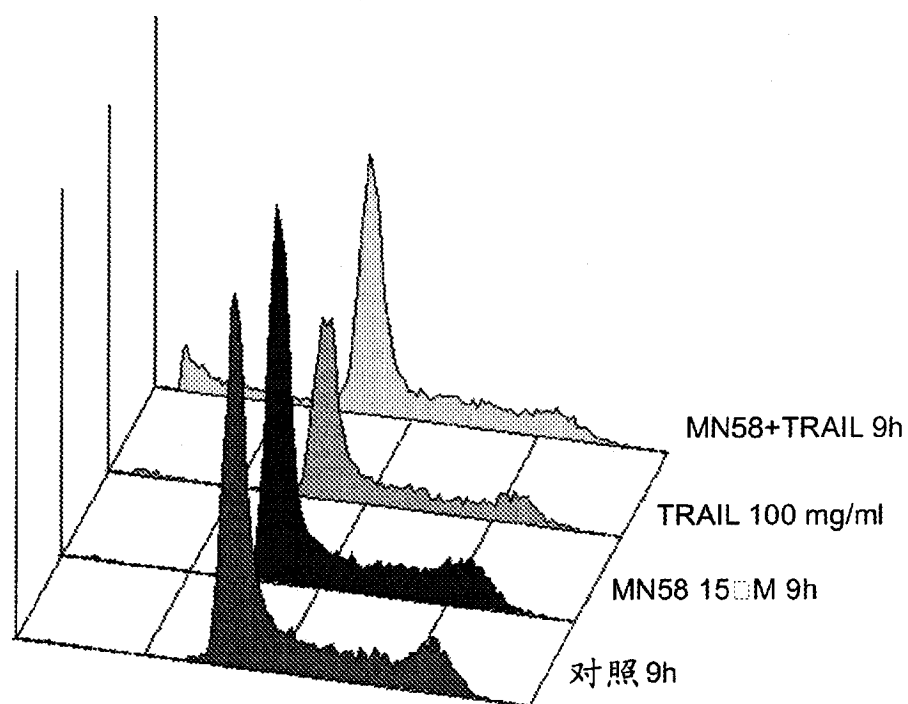
SW620细胞中RSM-932A/TRAIL



9h	凋亡	G0/G1	S	G2/M
对照	1,0	58,0	25,9	14,4
RSM-932A 15 μ M	1,9	60,4	25,0	12,0
TRAIL 20ng/ml	3,6	55,5	26,4	13,6
RSM-932A + TRAIL	23,3	46,5	21,6	7,5

图 11B

SW620细胞中MN58b/TRAIL



9h	凋亡	G0/G1	S	G2/M
对照	1,0	58,0	25,9	14,4
MN58b 15 μM	1,3	58,7	25,8	13,9
TRAIL 20ng/ml	3,6	55,5	26,4	13,6
MN58b + TRAIL	16,2	50,9	23,0	9,1

图 11C

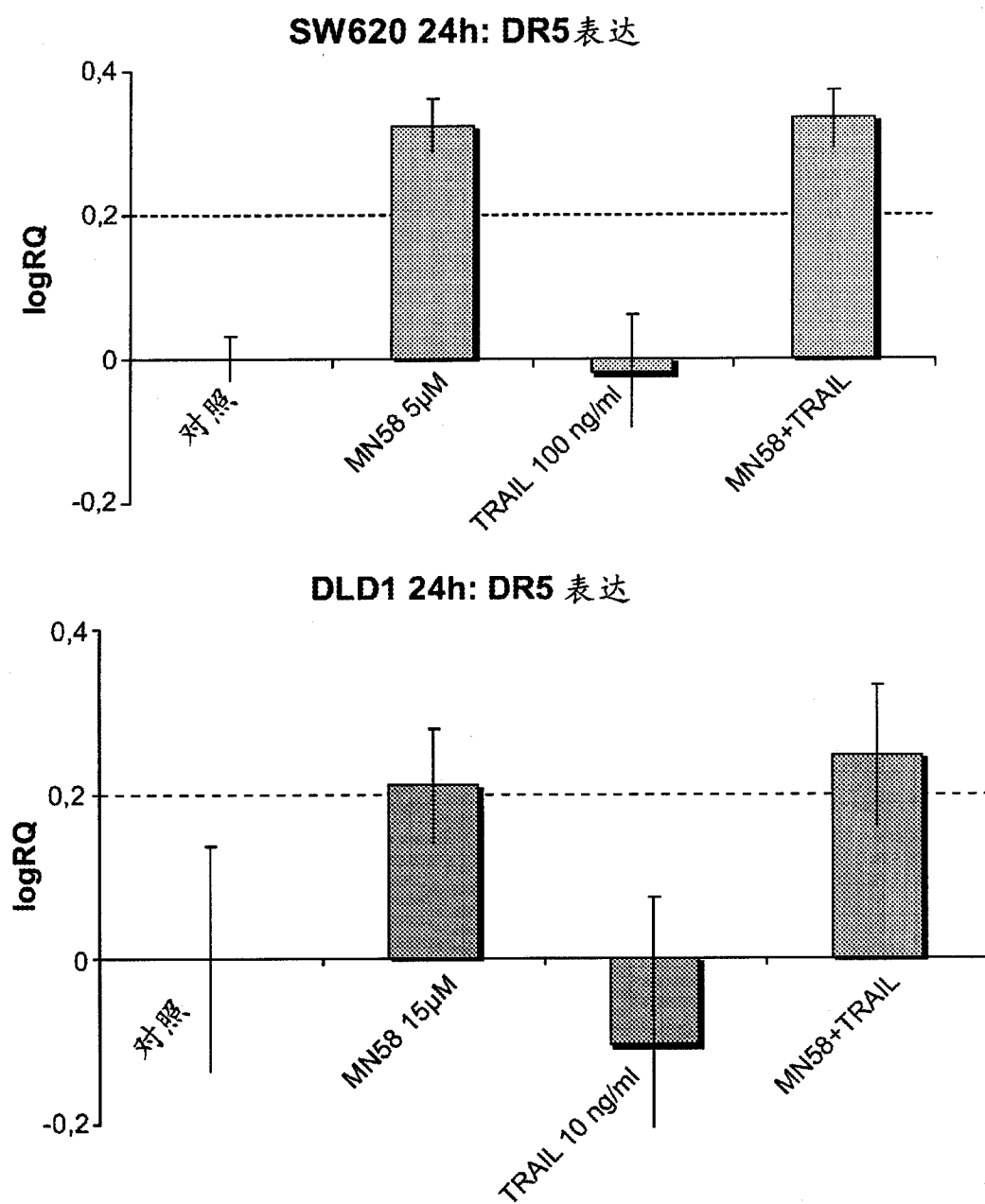


图 12

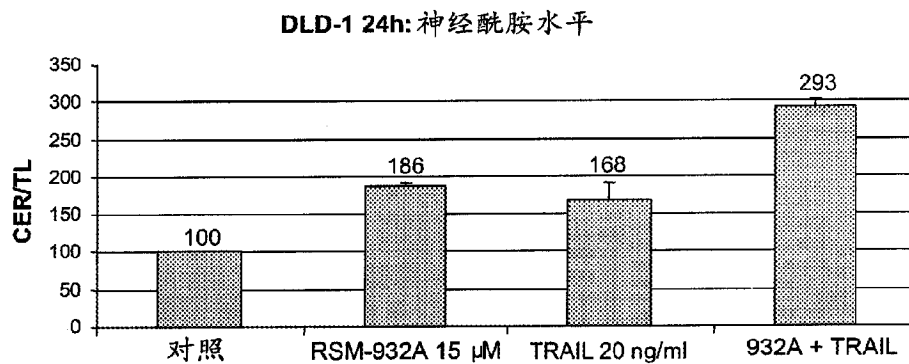
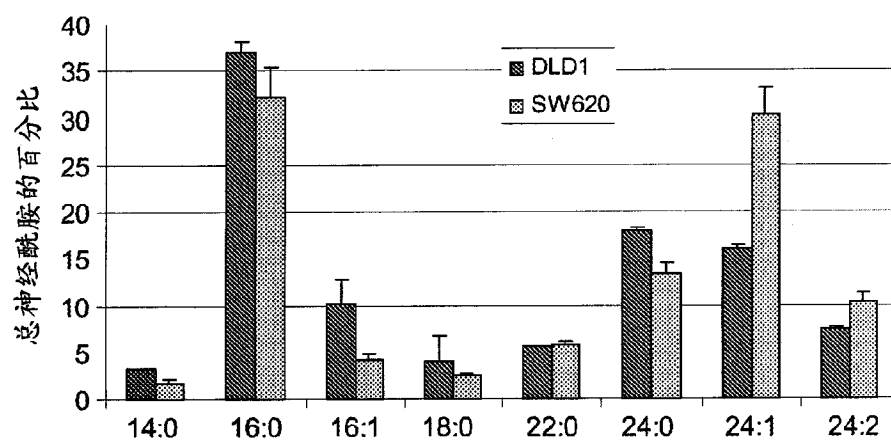
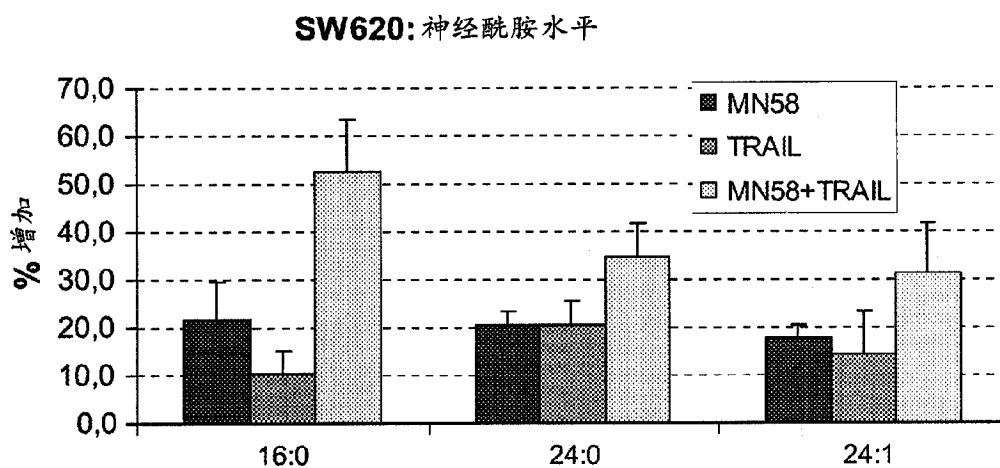
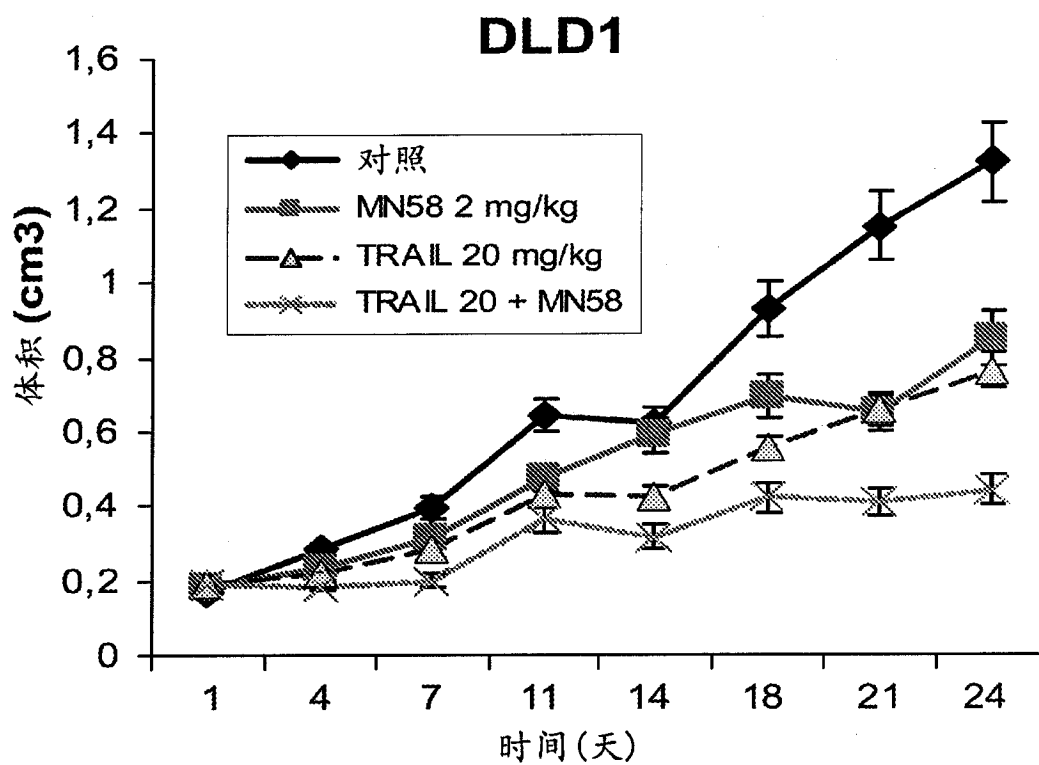
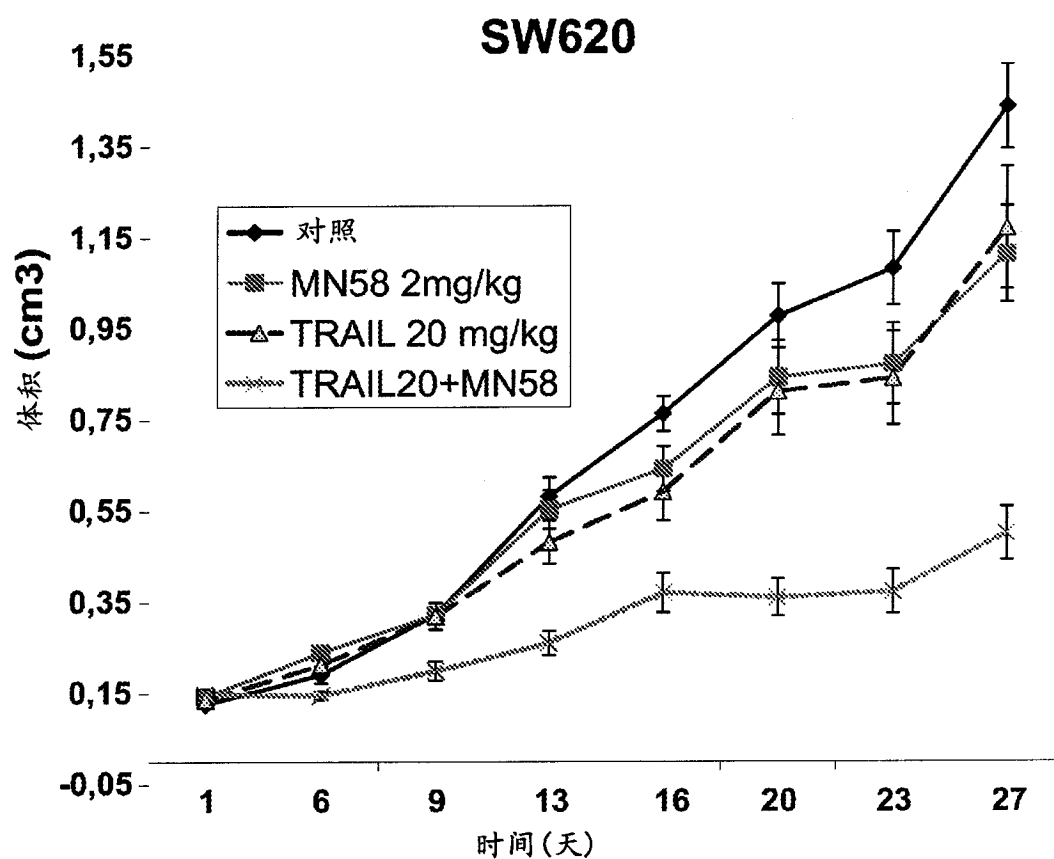
A**B****C**

图 13



	第24天 %抑制	p-值
MN58	42,58	0,00428676
TRAIL 20	50,78	0,00016458
T20+MN58	78,30	2,4727E-06

图 14A



	第27天	
	%抑制	p-值
MN58	26,03	0,0282404
TRAIL20	21,03	0,0734883
MN+T20	73,16	4,146E-05

图 14B

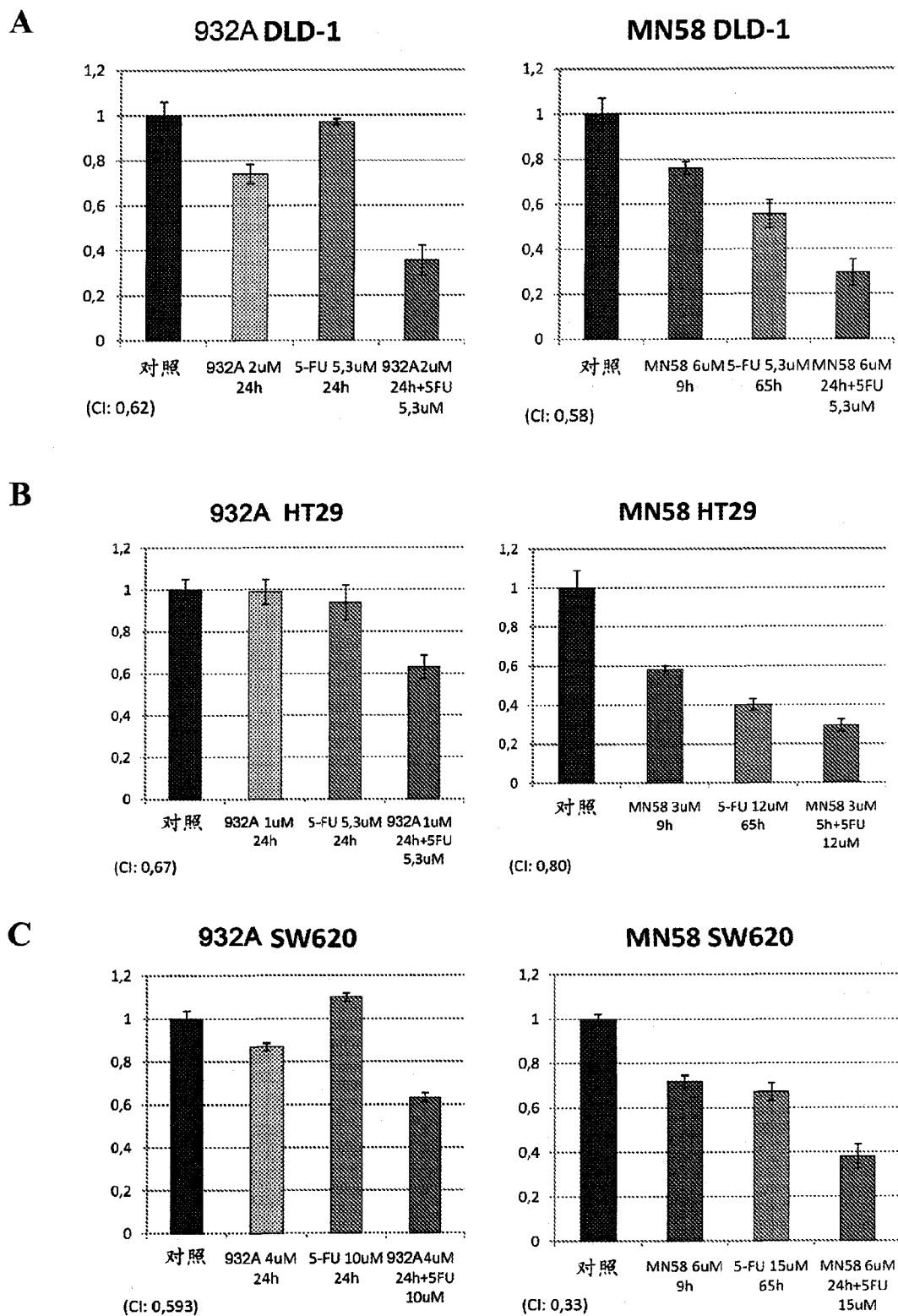
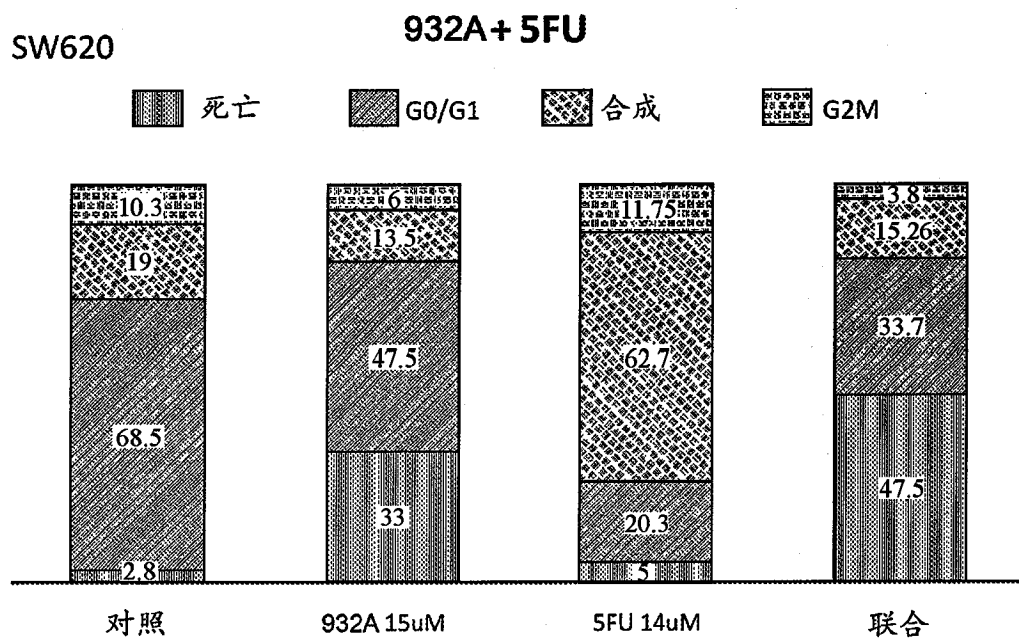


图 15

A



B

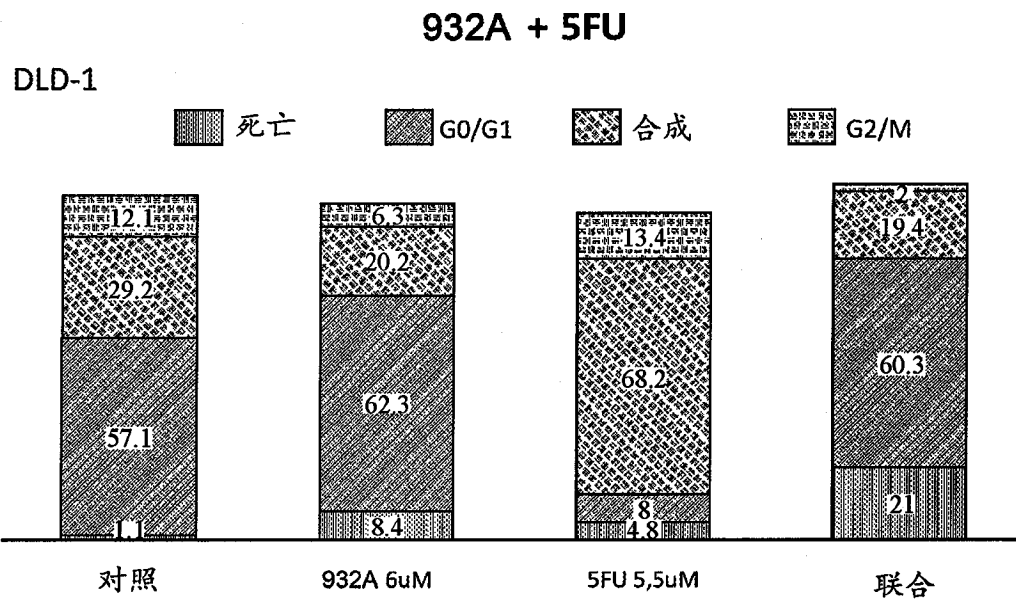
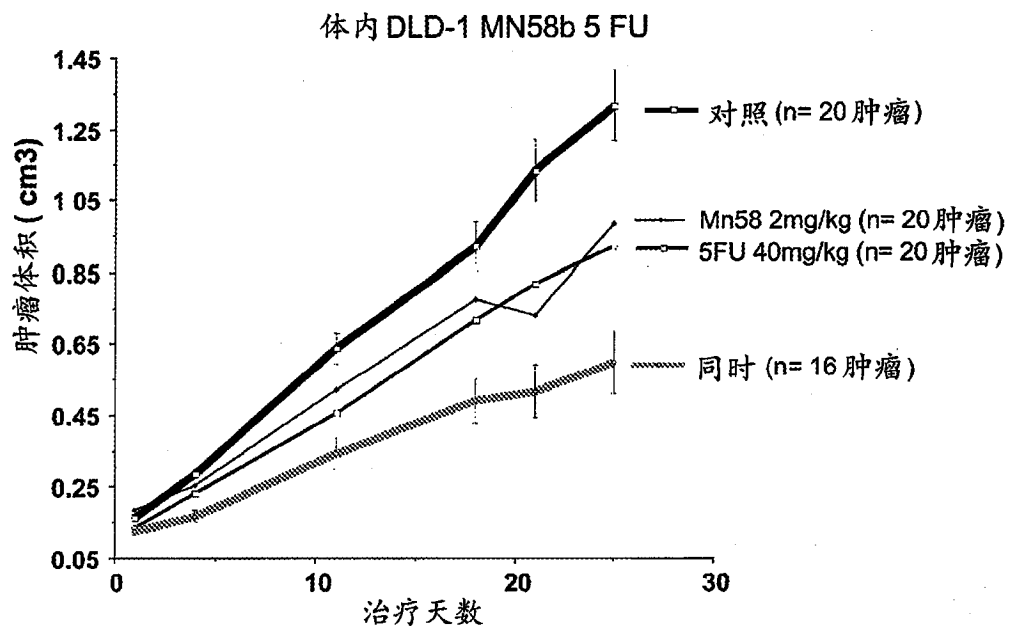
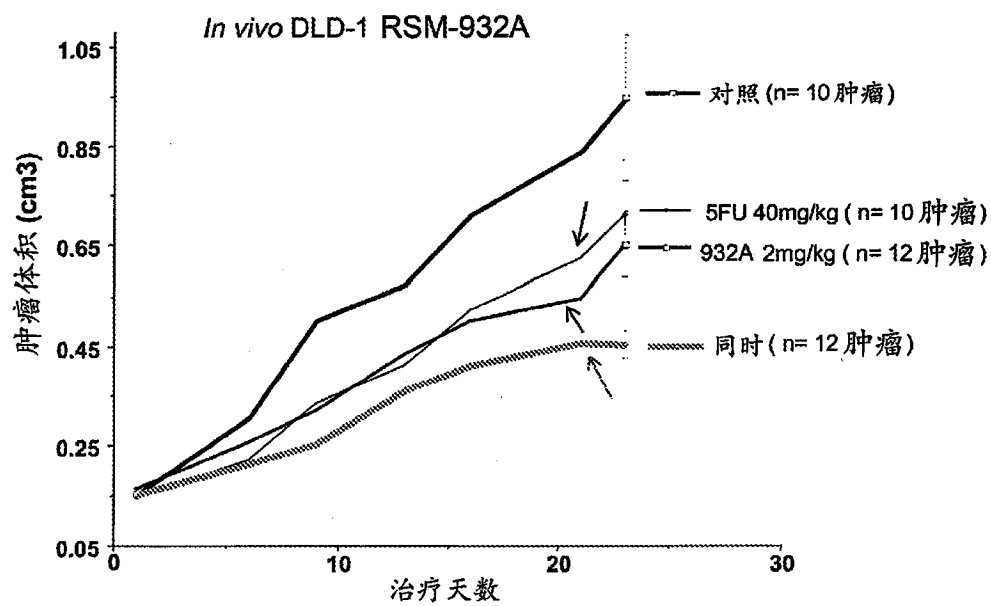


图 16



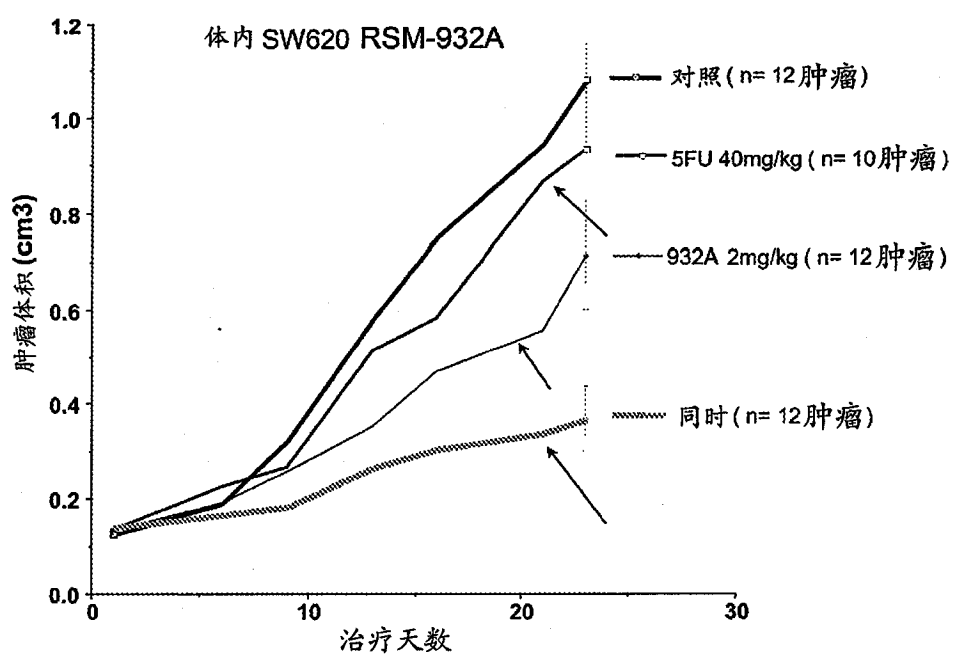
P- 值	对照	%降低
MN58b 2mg/kg	0,014	30,3206235
5FU 40mg/kg	0,004	31,647883
同时	5,27096E-05	58,6031421

图 17A



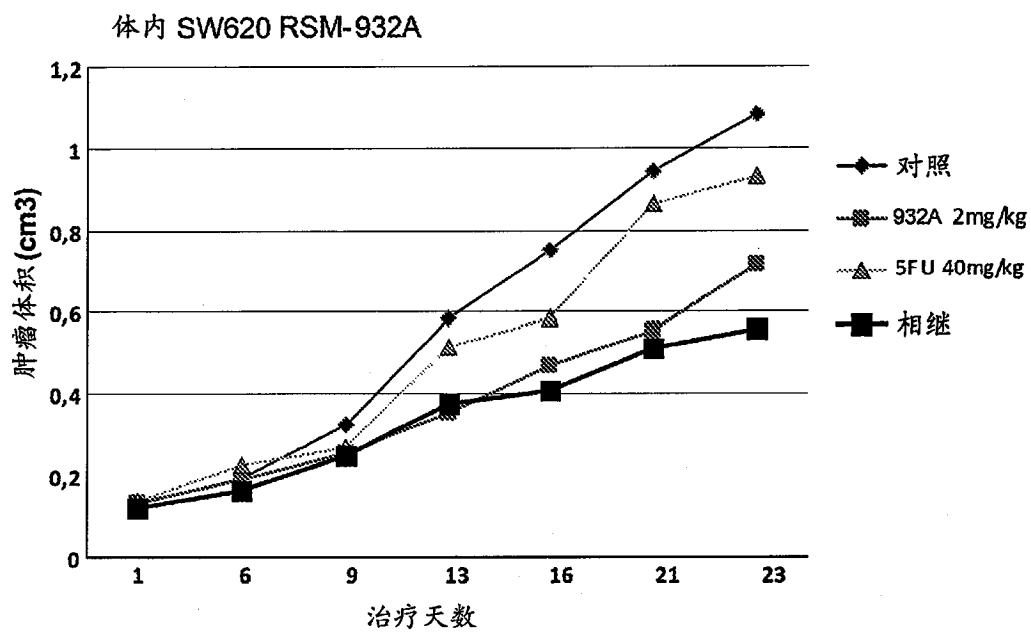
P-值	对照	%降低
932A 2mg/kg	0,176	28,96
5FU 40mg/kg	0,091	38,62
同时	0,0004711	62,03

图 17B



P- 值	对照	%降低
932A 2mg/kg	0,021	39,05
5FU40mg/kg	0,553	16,04
同时	0,0001096	76,18

图 17C



P-值	对照	%降低
932A 2mg/kg	0,021	39,05
5FU 40mg/kg	0,553	16,04
相继	0,00107	54,1

图 17D